

**Untersuchungen zur Regulation des
cAMP-Stoffwechsels in isolierten Fettzellen
unter dem Einfluß von
Katecholaminen und Insulin**

Hans Ulrich H ä r i n g

1977

Aus dem Institut für Diabetesforschung München

Vorstand: Prof. H. Mehnert

Prof. O. Wieland

Untersuchungen zur Regulation des
cAMP-Stoffwechsels in isolierten
Fettzellen unter dem Einfluß von
Katecholaminen und Insulin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Ulrich Häring

aus Stuttgart

München 1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz.Dr.K.D.Hepp

Mitberichterstatter: Prof.Dr.H.Mehnert

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.1977

Herrn Priv. Doz. Dr. K.D.Hepp danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, die ich unter seiner Leitung im Institut für Diabetesforschung ausgeführt habe. Er hat mir insbesondere bei der Auswertung und Niederschrift der Ergebnisse durch Diskussion und Kritik wertvolle Hilfe geleistet.

Herrn Dr. R.Renner danke ich für zahlreiche Anregungen, und besonders für die Hilfe, die er mir bei der Durchführung des Fettzelltestes und bei anderen methodischen Problemen gegeben hat.

Frau R.Anding danke ich für ihre wertvolle technische Hilfe.

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung und Zielsetzung</u>	1
2. <u>Verwendete Abkürzungen</u>	5
3. <u>Methoden und Materialien</u>	
3.1. Chemikalien und Geräte	6
3.2. Präparation isolierter Fettzellen	10
3.3. Inkubation mit Hormonen	10
3.4. Extraktion von cAMP	11
3.5 cAMP-Messung	12
4. <u>Optimierung der Inkubationsbedingungen</u>	18
4.1. cAMP-Basalspiegel	18
4.2. Katecholamin- und Insulinwirkung auf cAMP-Spiegel	18
4.3. Zeitfaktor bei Inkubation mit Kollagenase	19
4.4. Zeitfaktor bei Inkubation nach Auswaschen der Kollagenase	19
4.5. Einfluß der Zellkonzentration	20
4.6. Schüttelfrequenz	20
4.7. Einfluß der Ca^{++} -Konzentration im Inkubationsmedium	21
4.8. Einfluß der Glukose-Konzentration im Inkubationsmedium	21
5. <u>Wirkung von Rinder- und Puteninsulin auf cAMP-Spiegel und Lipolyse</u>	30
5.1. Rinderinsulin	30
5.2. Paradoxe Effekt unphysiologisch hoher Insulinkonzentrationen	36
5.3. Puteninsulin	36

6. <u>Wirkung von NSILA, Agmatin und Adenosin auf cAMP-Spiegel und Lipolyse</u>	37
6.1. NSILA	37
6.2. Agmatin	38
6.3. Adenosin	42
7. <u>Mechanismus der Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel</u>	48
7.1. Anfangskinetik der Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel	49
7.2. Insulineffekt auf den Abfall der cAMP-Spiegel in Gegenwart von Propranolol	53
7.3. Insulineffekt auf die cAMP-Synthese bei Verwendung von Phosphodiesterase-Hemmstoffen	55
8. <u>Diskussion</u>	60
8.1. cAMP-Synthese und Umsatzraten	60
8.2. Kontrolle des Äquilibriums der cAMP-Spiegel	65
8.3. cAMP-Syntheserate in Adenylatzyklasepräparationen und in der intakten Zelle	74
8.4. cAMP und ATP-Umsatz	75
8.5. Metabolisch aktives und inaktives cAMP	75
8.6. Insulin	77
9. <u>Zusammenfassung</u>	81
10. <u>Anhang</u>	82
11. <u>Literaturverzeichnis</u>	87
12. <u>Lebenslauf</u>	94

1. Einleitung und Zielsetzung

Die hormonelle Regulation der Lipolyse durch katabole Hormone und Insulin ist am Modell der isolierten Fettzelle der Ratte intensiv untersucht. Während eine ganze Reihe von Hormonen, wie Katecholamine, ACTH, TSH, LH, Glukagon und Sekretin in vitro die Lipolyse in Fettzellen stimulieren, ist Insulin das einzige bekannte Hormon, das antilipolytische Wirkung an der Fettzelle besitzt. Die genannten lipolytisch wirkenden Hormone besitzen gleichzeitig eine stimulierende Wirkung auf die cAMP-Spiegel der Fettzelle und die Adenylatzyklaseaktivität in Fettzellmembranen. Aufgrund der Parallelität von Dosiswirkungskurven des lipolytischen und des cAMP stimulierenden Effekts, wurde angenommen, daß ebenso wie in der Parenchymzelle der Leber, der Niere, der Nebenniere, der Schilddrüse und anderer hormonell regulierter Organe, auch in der Fettzelle cAMP eine zentrale Rolle bei der Vermittlung hormoneller Information spielt(1,2). Für diese Hypothese sprechen auch später durchgeführte Untersuchungen, die eine direkte Stimulierbarkeit der Lipolyse durch exogen zugeführtes cAMP nachwiesen (1), und Untersuchungen, die eine Interkonvertierung der Hormonsensitiven Lipase in Fettzellen durch cAMP ergaben (3). Während daher die in Abbildung 1 dargestellte Funktion von cAMP als "second messenger" der lipolytischen Hormone(4) weitgehend akzeptiert ist, ist die Rolle des zyklischen Nukleotids bei der Vermittlung des antilipolytischen Effekts von Insulin, nicht unumstritten.

Butcher und seine Mitarbeiter (5) haben in isolierten Fettzellen als erste einen Abfall des cAMP-Spiegels parallel zum antilipolytischen Effekt des Insulins beobachtet. In späteren Studien wurde dieser Befund zum Teil bestätigt (6-9), andere Gruppen fanden danach aber auch keinen Abfall des cAMP nach Insulin oder fanden eine ungenügende Korrelation zwischen Lipolyse, cAMP und Proteinkinaseaktivität

in Gegenwart von Insulin, und bezweifelten daher, daß eine cAMP-Senkung durch Insulin kausal für die Lipolysehemmung sei, bzw. den ausschließlichen antilipolytischen Wirkungsmechanismus von Insulin in der Fettzelle darstellt (10-12).

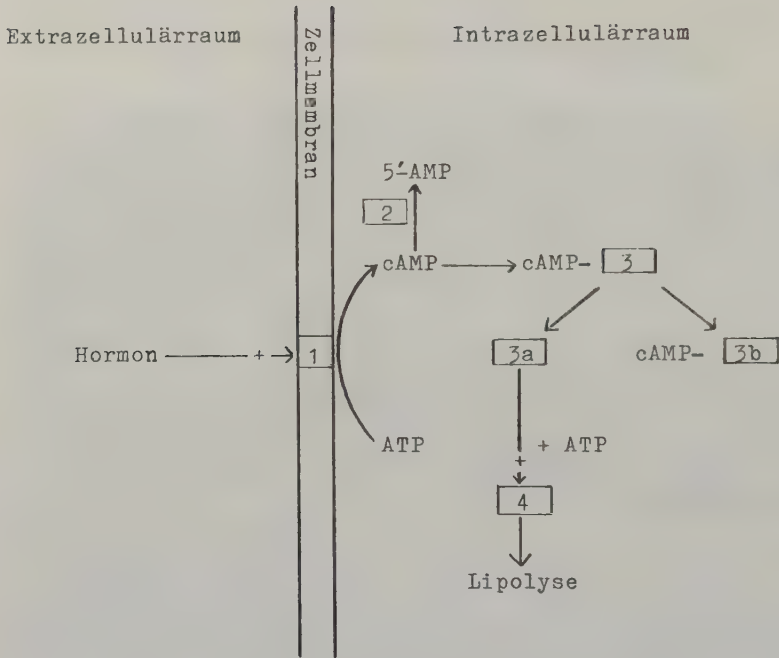
Daher wurde in neueren Arbeiten auch eine Rolle von cGMP (13,14) und Ca^{++} (12) als Überträgersubstanzen des Insulinsignals in der Fettzelle diskutiert.

Zusätzlich zu der Diskussion um die Frage, ob cAMP als einer der Vermittler, oder gar als die alleinige Überträger-substanz bei der Insulinwirkung anzusehen ist, blieb das Problem, wo Insulin in den cAMP-Stoffwechsel eingreift. So kann eine Senkung der cAMP-Spiegel unter Insulineinfluß sowohl über eine Hemmung der cAMP-Synthese, als auch über eine Aktivierung des cAMP-Abbaus zustandekommen. Zu der Frage, wo der Angriffspunkt des Insulins liegt, existieren sowohl Studien, die für einen Angriff an der Adenylatzyklase, als auch Studien, die für einen Angriff an der Phosphodiesterase sprechen: Hepp et al. (15) und Cuatrecasas et al. (16) fanden, daß an Membranpräparationen und Fettzellghosts die Wirkung lipolytischer Hormone auf die Adenylatzyklase durch Insulin gehemmt wird, und daß zwischen den Dosis-wirkungskurven dieses Insulineffekts und des antilipolytischen Insulineffekts eine gute Korrelation besteht. Da eine direkte Aktivierung der Phosphodiesterase in Fettzellghosts und Membranen durch Insulin nicht gefunden wurde, wurde angenommen, daß der primäre Angriffspunkt des Insulins an der Zykase liegt. Im Gegensatz hierzu wurde von Loten et al. und anderen Gruppen (17-20) eine Aktivierung der Phosphodiesterase in Fettzellhomogenaten gefunden, jedoch nur wenn die intakte Zelle mit Insulin vorbehandelt wurde. Dementsprechend sehen diese Untersucher den primären Angriffspunkt eher an der Phosphodiesterase. Nach neueren Untersuchungen von Hollenberg und Mitarbeitern (21) scheint die Wirkung von Insulin auf die Phosphodiesterase jedoch

an die Anwesenheit von Ca^{++} im Inkubationsmedium der Fettzellen gebunden zu sein, während der antilipolytische Effekt des Insulins unabhängig von der Ca^{++} -Konzentration ist. Es ist daher weiterhin unklar, welche Bedeutung die an den reduzierten Versuchssystemen Adenylatzyklase und Phosphodiesterase erzielbaren Insulineffekte für die Insulinwirkung auf cAMP im komplexeren System der intakten Zelle besitzen.

Die vorliegende Arbeit sollte nun zunächst nochmals die Beziehungen zwischen cAMP und antilipolytischem Effekt des Insulins, sowie der ebenfalls antilipolytisch wirkenden Substanzen NSILA, Agmatin und Adenosin untersuchen. Weiterhin soll der cAMP-Stoffwechsel in der intakten Zelle durch Kinetik-Studien, auch unter Verwendung von Hemmsubstanzen der Phosphodiesterase, untersucht werden, um Daten über den cAMP-Umsatz, die hormonelle Steuerung der Umsatzraten und eventuell vorhandene Regelmechanismen im cAMP-Stoffwechsel zu erhalten, und hierdurch auf die Angriffspunkte von Insulin im cAMP-Stoffwechsel der intakten Zelle schließen zu können.

Abb.1.



cAMP als "second messenger" lipolytisch wirkender Hormone

- 1 Adenylatzyklase
- 2 Phosphodiesterase
- 3 Proteinkinase mit regulatorischer (3b) und katalytischer (3a) Untereinheit
- 4 Hormon-sensitive Lipase

2. Abkürzungen

AMP	Adenosin - 5' - monophosphat
ATP	Adenosin - 5' - triphosphat
cAMP	Adenosin - 3' : 5' - cyclisches Monophosphat
cGMP	Guanosin - 3' : 5' - cyclisches Monophosphat
Ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Min.
EGTA	Äthylenglykoldiamintetraessigsäure
IBMX	Isobutyl-Methyl-Xanthin
Iso	Isoproterenol
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
NSILA	Nonsuppressible Insulinlike Activity

3.1. Chemikalien und Geräte

Chemikalien:

1. Tris-Puffer nach Heptner und Christ (23):

Tris I : 5.1 g NaCl
1.94 g $K_2 HPO_4 \cdot 3 H_2O$
2.4 g Tris
ad 500 ml Aqua bidest, mit 2 N HCl
auf pH 7.8

Tris II : 3.5 g NaCl
1.94 g $K_2 HPO_4 \cdot 3 H_2O$
2.4 g Tris
ad 500 ml Aqua bidest, mit 2 N HCl
auf pH 7.2

2. Albumin : Humanalbumin vom Schweizerischen Roten Kreuz,
Bern, Zentrallabor des Blutspendedienstes.
Die Albuminlösung wurde vor Gebrauch mehrfach
dialysiert.

3. Kollagenase : Worthington Biochemical Corporation
Collagenase CLS II 43 N 114.

4. (3H) cAMP : ($8 \cdot ^3H$) Adenosin 3', 5'-cyclic phosphate
von The Radiochemical Centre Amersham,
Spezifische Aktivität ca. 5 μCi in 180 pmol

5. cAMP-Messung: Cyclic AMP assay kit, code TRK. 432 von
The Radiochemical Centre Amersham.

6. Szintilla-
tionsmedium : Szintigel Roth, von C. Roth KG, Karlsruhe.

- | | |
|--------------------|--|
| 7. Isoproterenol : | DL-Isopropylarterenol HCl von
Serva Feinbiochemica, Heidelberg. |
| 8. Noradrenalin : | L-Noradrenalin Bitartrat von
Serva Feinbiochemica, Heidelberg. |
| 9. Adrenalin : | L-Adrenalin von Serva Feinbiochemica,
Heidelberg. |
| 10. Phenylephrin : | Adrianol (R) |
| 11. Propranolol : | Propranolol - HCl von Rhein-Chemie. |
| 12. Insulin : | Novo Beef MC |
| 13. EGTA : | Ethyleneglycol - bis -(-Amino-
Ethyl-Ether) N, N'-Tetra-Acetic
Acid von Sigma, Chemical Company,
St. Louis, USA. |
| 14. Puteninsulin : | - wurde von Dr. R. Renner, Institut
für Diabetesforschung, München, zur
Verfügung gestellt. |
| 15. NSILA : | - wurde von Prof. E.R.Froesch,
Kantonsspital Zürich, zur Verfügung
gestellt. |
| 16. Agmatin : | Agmatinsulfat, von Serva Feinbioche-
mica, Heidelberg. |
| 17. Adenosin : | von Boehringer, Mannheim |

18. Aminophyllin : Apotheke des Krankenhauses, München-Schwabing.
19. Theophyllin : Theophyllinaethylendiamin, Apotheke des Krankenhauses München-Schwabing
20. IBMX : 1-Methyl-3-Isobutyl-Xanthin von EGA - Chemie KG, Steinheim.

Geräte:

Inkubationsbad: Köttermann

Ultraschall Homogenisator : Braun Sonic 125

Zentrifugen : Sorvall RC2-B, Eppendorf Tisch-
zentrifuge, Hettich Rotixa

Gefriertrockner : L 2 WKF, Brandau, Darmstadt

Szintillationszähler : Mark II Liquid Szintillation
System, Searle Comp. USA

pH-Meter : Püsl München

3.2. Präparation isolierter Fettzellen

Die Präparation isolierter Fettzellen wurde nach der Methode von Rodbell (22), jedoch mit einem modifizierten Puffersystem nach Heptner und Christ (23) ausgeführt. Männliche Wistar Ratten von 130 - 150 Gramm wurden durch Dekapitation getötet und der epididymale Fettkörper herauspräpariert. Zur Lösung der bindegewebigen Bestandteile wurden die Fettstückchen in 3 ml Tris I/5 g % Albumin-Puffer mit 6 mg Kollagenase im Wasserbad bei 37 ° C und einer Schüttelfrequenz von 100/min. für 55 Minuten inkubiert. Vor Beginn der Inkubation wurde das pH der Fettsuspension durch Begasen mit CO₂/O₂ (95 %/5 %) auf 7,4 eingestellt. Nach der Inkubation wurde die Suspension mit 7 ml Tris II/2,5 g % Albumin-Puffer (37 ° C) verdünnt und durch Nylongewebe gefiltert, um ungelöste Gewebspartikel und Gefäßreste abzutrennen. Zur Trennung der isolierten Fettzellen vom kollagenasehaltigen Inkubationsmedium und den übrigen zellulären Bestandteilen des Fettgewebes, wurde die Suspension vorsichtig zentrifugiert und das Inkubationsmedium abgesaugt. Die Zellen im Überstand wurden anschließend mit 4 x 10 ml Tris II Albumin-Puffer (37 ° C) gewaschen und auf die gewünschte Zellkonzentration verdünnt.

3.3. Inkubation mit Hormonen

Die Hormoneffekte auf isolierte Fettzellen wurden mit zwei verschiedenen Inkubationstechniken getestet. Bei beiden Methoden wurden die Zellsuspensionen vor Hormonzugabe 5 Min. zur Äquilibration im Wasserbad bei 37 ° C inkubiert.

3.3.1. Eine Zellsuspension von $1,2 - 1,6 \times 10^5$ Zellen/ml wurde in Einzelproben von 2,5 ml in geschlossenen Polyäthylenröhrchen im Wasserbad bei 37°C unter dauerndem Schütteln inkubiert. Vor Reaktionsstart der einzelnen Proben durch zeitlich versetzte Hormonzugabe zum Inkubationsmedium, wurde das pH der Proben durch NaHCO_3 -Lösung auf 7,4 eingestellt. Der Stop der Zellreaktionen erfolgte ebenfalls zeitlich versetzt durch Zugabe von 0,5 ml eisgekühlter Trichloressigsäure (30 g %).

3.3.2. Bei Messung der Anfangskinetik der cAMP-Spiegel nach Hormonreiz mit kurzen Meßintervallen wurde die Methode etwas abgeändert. 30 ml Zellsuspension von $1,5 - 1,6 \times 10^5$ Zellen/ml wurden im offenen Plastikgefäß bei 37°C im Wasserbad mit einem Magnetrührer inkubiert. In möglichst kurzen Zeitabständen nach pH-Einstellung mit NaHCO_3 und Reaktionsstart durch Hormonzugabe zum Inkubationsmedium wurden Proben von 2,5 ml entnommen und sofort mit 0,5 ml 30 g %-iger Trichloressigsäurelösung gefällt.

3.3.3. Die Proben, in denen Glycerinfreisetzung parallel zur Bestimmung der cAMP-Spiegel gemessen wurde, wurden in Eis gestoppt und Medium und Zellen durch Papierfilter getrennt. Die Glycerinbestimmung wurde nach der von Eggstein und Kuhlmann beschriebenen enzymatischen Methode ausgeführt (24).

3.4. Extraktion von cAMP (25 modifiziert)

Nach der Trichloressigsäurefällung wurde jede Probe durch Sonication (Braun, Sonic 125, Stufe 60, 20 sec) homogenisiert und anschließend bei $40\,000 \times g$ zentrifugiert (Sorvall). Aus dem klaren Überstand wurden 2 ml abgenommen und die Trichloressigsäure unter Zusatz von 0,1 ml 1 n HCl

durch Waschen mit Diäthyläther (5 x 7-faches Volumen) entfernt. Die Proben wurden danach neutralisiert und gefriergetrocknet (WKF). Das Trockenpulver wurde zur cAMP-Bestimmung in 0,2 - 0,4 ml Tris (0,05 M) EDTA (4 mM) - HCl-Puffer, pH 7,5, aufgenommen und das pH in jeder Probe kontrolliert.

Die Wiederfindungsrate wurde in Vorversuchen mit (^3H) cAMP als Tracer kontrolliert. Sie betrug 92 %.

3.5. cAMP-Messung

Die Messung der cAMP-Spiegel wurde mit einem kommerziellen Proteinbindungs-assay von "The Radiochemical Centre Amersham" durchgeführt. Parallel dazu wurde ein Testsystem nach Brown et al. erprobt, welches eine Bindungsproteinpräparation aus Rinder-Nebennierenrinde verwendet (26).

Obwohl Proteinbindungs-assays bereits zu routinemäßigen Bestimmungen in der endokrinologischen Diagnostik verwendet werden, und daher die theoretischen Grundlagen dieser Meßmethode allgemein bekannt sind, soll hier noch kurz auf einige für das praktische Arbeiten mit dieser Methode wichtige Prinzipien eingegangen werden:

Proteinbindungs-assays für cAMP wurden von mehreren Gruppen beschrieben (26-30). Sie besitzen gegenüber älteren cAMP-Meßverfahren, bei denen die Aktivierung von Phosphorylase durch cAMP (31-33), die Konkurrenz von (^3H) cAMP und cAMP an der Phosphodiesterase (34), der Abbau von cAMP zu AMP und die Bestimmung von AMP (35,36), sowie die Isotopen-Verdünnungsmethode (37) zur cAMP-Bestimmung herangezogen wurden, eine größere Meßgenauigkeit und Sensibilität. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Konkurrenz unmarkierten und Tritium-markierten cAMP's um die Rezeptorstellen einer cAMP spezifisch bindenden Proteinkinase, die aus Rindermuskel (27) oder Rinder-NNR (26) und anderen Geweben präpariert wird. Als Indikator für die Menge unmarkierten cAMP's, das in einer Testprobe mit (^3H) cAMP um

die Bindungsstellen der Proteinkinase konkurriert, dient die Radioaktivität des Proteinkinase-cAMP-Komplexes, die bei steigender Konzentration von unmarkiertem cAMP im Testansatz abnimmt. Zur Messung der Aktivität des Proteinkinase-cAMP-Komplexes muß der Überschuß an (^3H) cAMP, der nicht gebunden wurde, abgetrennt werden. Als Trennverfahren werden Filtration und Adsorption an Kohle verwandt.

Die theoretischen Grundlagen der Methode wurden von R.P. Ekins (38) formuliert. Für eine optimale Anpassung des Meßverfahrens an den Konzentrationsbereich, in dem cAMP gemessen werden soll, sind folgende Punkte wichtig:

Linearität und Steigung der Eichkurve des Tests, und damit Sensibilität und Meßbereich sind unter anderem durch die Konzentration des Tracers und des Bindungsproteins bestimmt. Durch Variation dieser Größen lassen sich Sensibilität und Meßbereich beeinflussen (26,27).

- a) Linearität der Eichkurve in einem logarithmischen Koordinatensystem wird erreicht, wenn die Konzentration des Tracers (^3H) cAMP im Testansatz die Gesamtbindungskapazität der Proteinkinase überschreitet und somit eine komplette Absättigung aller Bindungsstellen vorliegt. Bei inkompletter Absättigung der Bindungskapazität erfolgt bei Zusatz von unmarkiertem cAMP zunächst keine Verdrängung des (^3H)cAMP aus der Bindung, sondern eine weitere Aufsättigung der Bindungskapazität des Proteins. Die Linearität der Eichkurve wird bei einem Überschuß an Tracer von mehr als 60 % erreicht (27).
- b) Die Steigung der Eichkurve, d.h. die Sensibilität des Meßsystems und der Meßbereich werden durch die Menge des Tracers und das davon abhängige Verhältnis Tracer zu unmarkierter Substanz bestimmt. Daraus läßt sich ableiten, daß der Bereich der größten Meßgenauigkeit auf der Eich-

kurve im Konzentrationsbereich des Tracers liegt, daß hohe Sensitivität mit kleinen Tracer-Mengen und großer Meßbereich mit hohen Tracer-Mengen erreicht wird.

3.5.1. Präparation von Bindungsprotein aus Rinder-INR

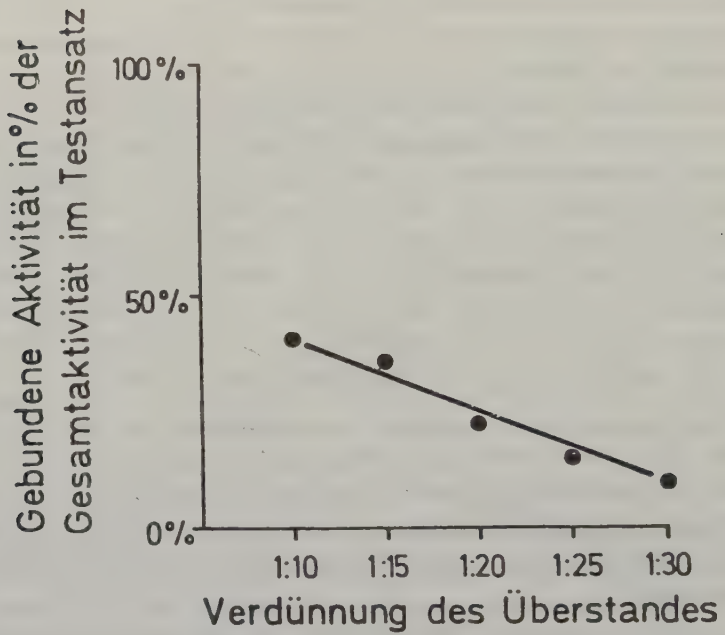
Die Präparation wurde nach der von Brown et al. beschriebenen Methode durchgeführt (26).

Schlachtfrische Rindernebennieren wurden präpariert und mit dem 1,5-fachen Volumen eines 0,05 M Tris HCl-Puffers (pH 7,4, 0,25 M Sucrose, 0,025 M KCl, 5 mM MgCl) homogenisiert. Das Homogenat wurde 5 Minuten lang bei 2000 x g zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde nochmals für 15 Minuten bei 5000 x g (Sorvall) zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde portionsweise bei - 20 ° C aufbewahrt.

Bindungskapazität des Überstandes

Mit 0,9 pmol (^3H) cAMP als Tracer wurde die Bindungskapazität von 0,1 ml Überstand bei verschiedenen Verdünnungen bestimmt. Es wurde hierbei die Methode angewandt, die unten für die cAMP-Messung beschrieben wird (Abb.3.2.).

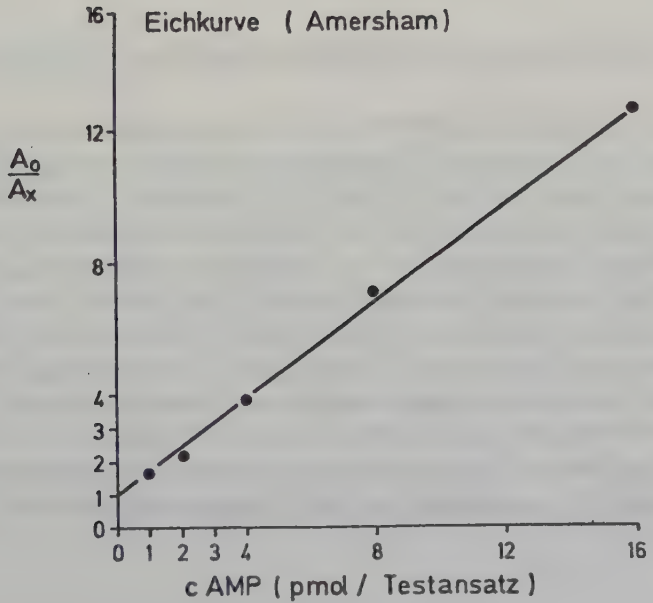
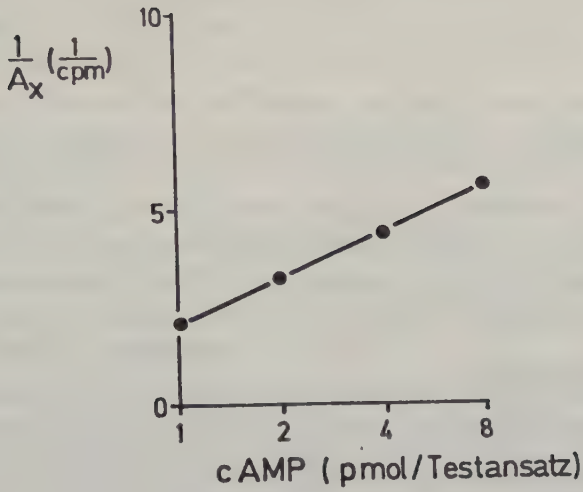
Abb. 3.2.



Bindungskapazität des NNR-Extraktes, gemessen im Überstand nach der zweiten Zentrifugation.

Eichkurve (Bindungsprotein aus NNR)

Abb. 3.3.



4. Optimierung der Inkubationsbedingungen

In einer Reihe von Vorversuchen wurde zunächst die Wirkung verschiedener Katecholamine auf die cAMP-Spiegel der Fettzellen getestet, und die maximal wirkende Katecholaminkonzentration bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß der Inkubationsbedingungen auf die Katecholamin- und Insulineffekte untersucht. Insulin wurde hierbei in einer Konzentration von 100 μ E/ml verwendet. Bei der Konzentration hemmt Insulin die Lipolyse bzw. stimuliert die Glukoseoxydation der Fettzelle maximal (39).

4.1. cAMP-Basalspiegel

Ohne Zusatz von lipolytischen Hormonen im Inkubationsmedium lagen die cAMP-Spiegel bei $1,84 \pm 0,1$ S.E.M. pmol/ 10^5 Zellen (n=25) (gemessen nach einer Äquilibrationszeit von ca. 5 Minuten). Diese Basalspiegel blieben bei Inkubation bis zu 1 Stunde konstant.

4.2. Katecholamin- und Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel

Die Kinetik der cAMP-Spiegel nach Stimulation der Fettzellen mit Isoproterenol, Noradrenalin und Adrenalin (alle 10^{-6} M) zeigt bereits nach 2 Minuten ein maximales Ansteigen der Spiegel auf das 2- bis 4-fache des Basalwertes (Abb. 4.1.). Während Katecholamine mit β -adrenerger Wirkung eine deutliche Erhöhung der cAMP-Spiegel induzieren, zeigt Phenylephrin, das eine selektive α -adrenerge Wirkung besitzt, keinerlei Effekt auf die Spiegel. Gleichzeitige Stimulierung der Zellen mit Katecholaminen und Insulin führten zu einem deutlich geringeren Anstieg des cAMP-Spiegels. Da der Insulineffekt bei allen drei β -adrenergen Katecholaminen gleich deutlich ausgeprägt war, mit Isoproterenol aber die deut-

lichste Erhöhung der Spiegel erzielt wurde, wurde für die weiteren systematischen Untersuchungen Isoproterenol in einer Konzentration von 10^{-6} M, bei der nahezu Maximalwirkung erreicht wird (Abb. 4.2.), verwendet.

4.3. Zeitfaktor bei der Inkubation mit Kollagenase

Um zu klären, ob unterschiedlich lange Einwirkungszeiten der Kollagenase die Reaktionsfähigkeit der Fettzellen auf Hormonreize beeinflussen können, wurde Fettgewebe in Parallelansätzen 40 bzw. 70 Minuten lang mit Kollagenase (2 mg/ml) inkubiert.

Hierbei zeigte sich, daß weder die Kinetik, noch die absolute Höhe der cAMP-Spiegel unter Basalbedingungen, Isoproterenoleinfluß und Isoproterenol + Insulin sich deutlich von den Werten unterscheiden, die in Zellsuspensionen nach vorheriger 55-minütiger Inkubation des Fettgewebes mit Kollagenase gemessen werden.

4.4. Zeitfaktor bei der Inkubation nach dem Auswaschen der Kollagenase

Aus Daten von Schwabe et al. (40) geht hervor, daß die Stimulierbarkeit der Fettzellen durch Isoproterenol innerhalb kurzer Zeit nach dem Auswaschen der Kollagenase abnimmt. Da unter diesen Bedingungen eine zeitlich versetzte Stimulation mehrerer Zellproben mit Hormonen keine vergleichbaren Daten ergeben würde, wurde die Stimulation der cAMP-Spiegel durch Isoproterenol in Zellsuspensionen gemessen, die nach dem Auswaschen der Kollagenase unterschiedlich lange im Wasserbad ohne Hormonzugabe inkubiert wurden.

Hierbei zeigte sich nur ein geringer Abfall der Stimulierbarkeit. Die Stimulationsrate lag 1 Stunde nach Beendigung

der Zellpräparation nur um ca. 20 % unter einem Kontrollwert der 10 Minuten nach Beendigung der Zellpräparation gemessen worden war (Tab. 4.1.).

4.5. Einfluß der Zellkonzentration

Ebenfalls von Schwabe et al. (40) war über einen starken Einfluß der Zellkonzentration auf den Bereich der cAMP-Spiegel berichtet worden. Bei der vorliegenden Studie fand sich in einem Konzentrationsbereich zwischen $1 - 1,6 \times 10^5$ Zellen/ml keine Abhängigkeit der Spiegel von der Zellkonzentration. Erst bei einer stark erniedrigten Zellkonzentration von 2×10^4 Zellen/ml wurden deutlich erhöhte Spiegel gefunden. Da jedoch fast alle Untersuchungen über die hormonelle Regulation von Lipolyse und cAMP-Konzentration mit Zellzahlen von mindestens 10^5 /ml durchgeführt wurden (7, 9, 6, 41 u.a.) erschien es sinnvoll, die weiteren Studien mit ähnlichen Zellzahlen durchzuführen, um die Ergebnisse mit Daten aus der Literatur vergleichen zu können (Tab. 4.2.).

4.6. Schüttelfrequenz während der Inkubation

Bei der Inkubation der Fettzellen in Einzelproben in geschlossenen Polyäthylenröhrchen waren die Stimulationsraten der cAMP-Spiegel und die Glycerinfreisetzung in Gegenwart von Isoproterenol abhängig von der Frequenz mit der die Proben geschüttelt wurden. Bei der Inkubation mit Magnetrührer im offenen Plastikgefäß war die Stimulationsrate am kleinsten (Tab. 4.3.).

4.7. Einfluß der Ca^{++} -Konzentration im Inkubationsmedium

In mehreren neueren Arbeiten (3,12,21) wurde eine Rolle von Calcium bei der Regulation des cAMP und der Lipolyse diskutiert. Desai und Hollenberg fanden eine Reduzierung des Insulineffekts auf die Phosphodiesterase in intakten Zellen bei Verwendung von Calcium-freien Inkubationsmedien, und ein völliges Verschwinden des Insulineffekts bei Vorbehandlung der Zellen mit EGTA (21). Ferner beschrieben Tulloch Kissebah und Frazer einen Effekt der Calciumkonzentration auf die cAMP-Bindung durch die Proteinkinase, was die Autoren ebenfalls in Zusammenhang mit der Insulinwirkung diskutierten (12).

Nach neueren Untersuchungen von Fain et al. (14) bleibt der antilipolytische Effekt von Insulin bei Entzug von Ca^{++} durch EGTA jedoch vollkommen unverändert erhalten. Die vorliegenden Ergebnisse, zusammengefaßt in Tabelle 4.4. zeigen nur sehr geringfügige Änderungen der cAMP-Spiegel bei Veränderungen der Calciumkonzentration im Inkubationsmedium, wie auch nach Vorbehandlung der Zellen mit EGTA. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, daß Ca^{++} eine wesentliche Rolle bei der Senkung der cAMP-Spiegel und bei der Antilipolyse durch Insulin spielt.

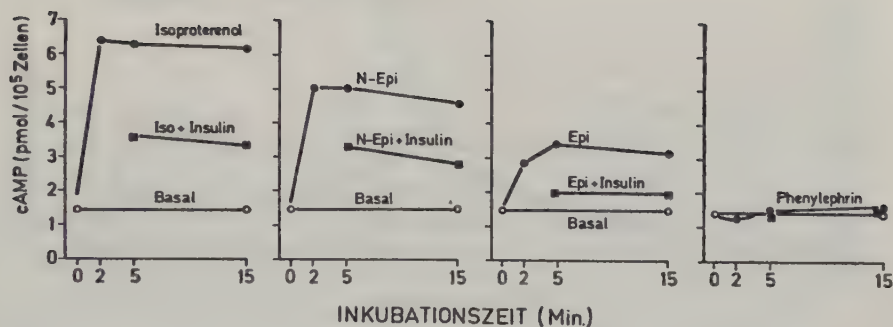
4.8. Einfluß der Glukosekonzentration im Inkubationsmedium

Einen Einfluß von Glukose im Inkubationsmedium auf die cAMP-Spiegel und Lipolyseraten in isolierten Fettzellen (3,43) und Fettstückchen (44) wurde mehrfach beschrieben. Als Wirkungsmechanismus wird die Erhöhung der ATP-Spiegel der Fettzelle in Anwesenheit von Glukose diskutiert, die über ein erhöhtes Substratangebot an die Adenylatzyklase oder eine direkte Hemmung der Phosphodiesterase durch ATP, erhöhte cAMP-Spiegel zur Folge haben könnten (43). Während Ho et al. (43) und Khoo et al. (3) schon bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten höhere

cAMP-Spiegel in Anwesenheit von Glukose fanden, wurde dieser Effekt bei den Studien von Knight et al.(44) erst nach längeren Inkubationszeiten (20 Minuten) in Gegenwart von Noradrenalin sichtbar.

Auch bei unseren Messungen ergaben sich bei Inkubationszeiten bis zu 12 Minuten keine deutlichen Differenzen zwischen beiden Inkubationsbedingungen (Abb. 4.4.).

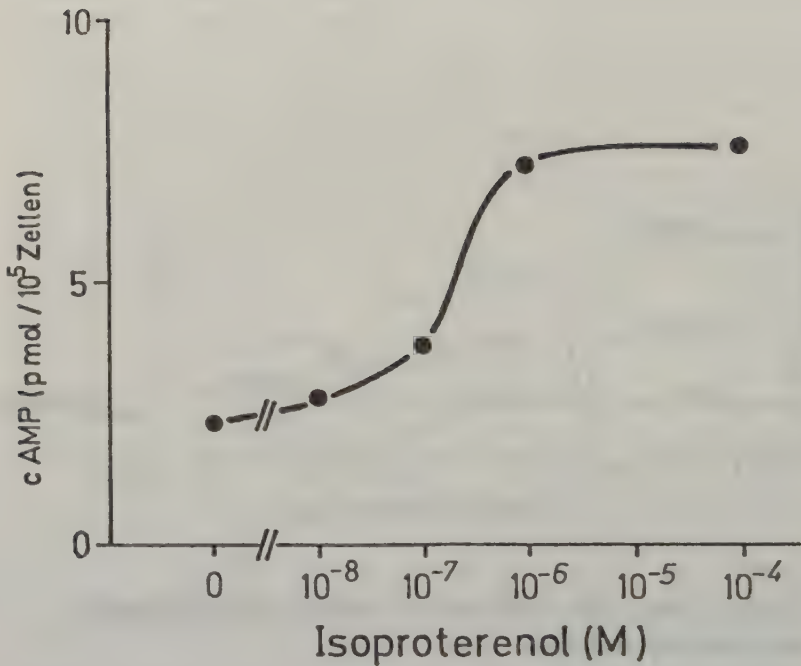
Abb. 4.1.



Effekt von α - und β -adrenerg wirkenden Katecholaminen auf die cAMP-Spiegel

Isoproterenol, Noradrenalin (N-Epi), Adrenalin (Epi) und Phenylephrin, alle $10^{-6}M$, wurden allein, bzw. gleichzeitig mit Insulin ($100 \mu E/ml$) zum Inkubationsmedium zugesetzt, die cAMP-Spiegel wurden nach 2, 5 und 15 Min. gemessen. Basal o-o, Katecholamin •-•, Katecholamine + Insulin ■-•, Inkubationsbedingungen wie 3.3.1.

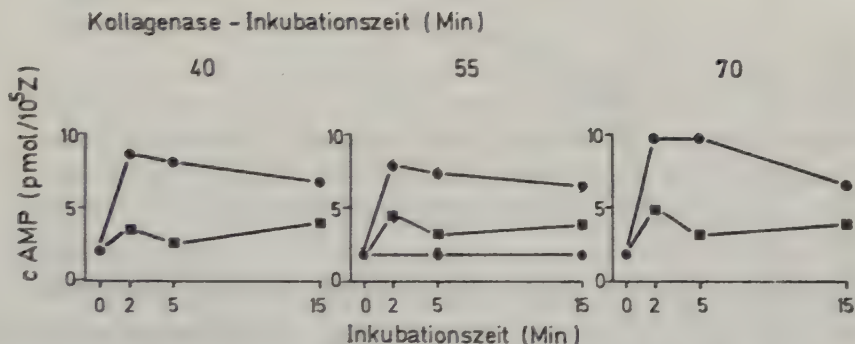
Abb. 4.2.



Dosis-Wirkungskurve von Isoproterenol

Der Effekt auf die cAMP-Konzentration wurde 5 Min. nach Zugabe von Isoproterenol zum Inkubationsmedium in den oben angegebenen Konzentrationen bestimmt. Inkubationsbedingungen wie 3.3.1.

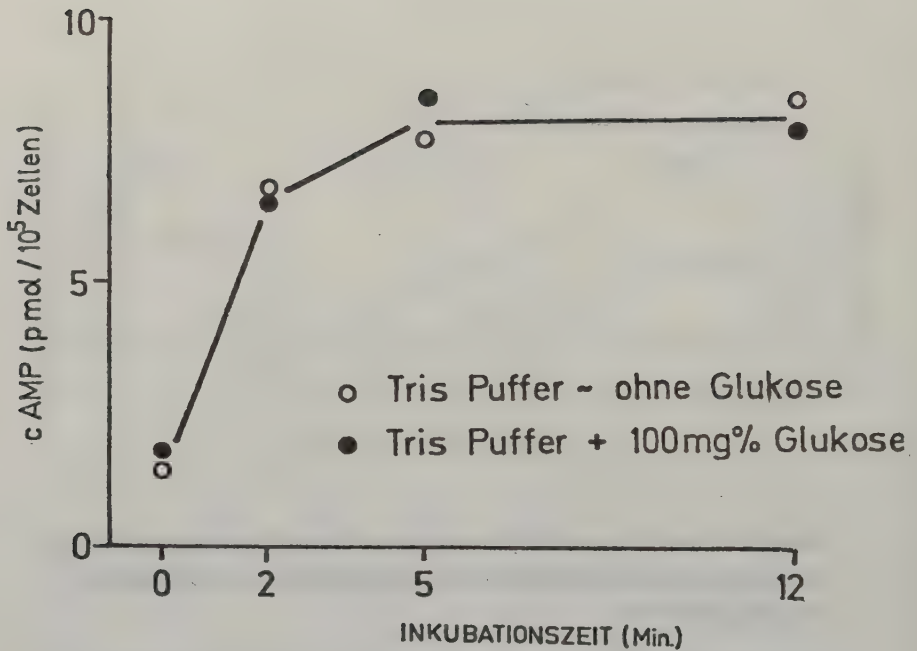
Abb. 4.3.



Stimulierbarkeit isolierter Fettzellen durch Isoproterenol
und Insulin in Abhängigkeit von der Dauer der Inkubation
mit Kollagenase

Fettstückchen wurden 40, 55 und 70 Min. mit Kollagenase inkubiert, isolierte Fettzellen jeweils wie oben beschrieben präpariert, und cAMP-Kinetiken in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) ●-●, und Isoproterenol (10^{-6} M) + Insulin (100 µE/ml) ■-■ mit der unter 3.3.1. beschriebenen Methode in den 3 Zellsuspensionen gemessen.

Abb. 4.4.



Der Einfluß von Glukose auf die Isoproterenolwirkung

Zellen wurden 5 Min. in Tris II-Puffer mit Glukose (5.5mM) vorinkubiert, Kontrollproben wurden in Glukose-freiem Tris II-Puffer inkubiert. Isoproterenol (10^{-6} M) wurde zum Inkubationsmedium zugesetzt und die cAMP-Spiegel nach 2,5 und 12 Min. gemessen. Inkubationsbedingungen wie 3.3.1.

Tab. 4.1. Einfluß der Äquilibrationszeit auf die Stimulierbarkeit der Fettzellen

Fettzellsuspensionen wurden nach dem Auswaschen der Kollagenase unterschiedlich lang im Wasserbad inkubiert, Isoproterenol wurde danach zu den in der Tabelle angegebenen Zeitpunkten dem Inkubationsmedium zugesetzt und der Effekt auf die cAMP-Spiegel nach 3 bzw. 5 Min. gemessen (Isoproterenol bei allen Experimenten 10^{-6} M, Insulin 100 μ E/ml). Bei Experiment 1-3 Inkubationsmethode 3.3.2, Inkubationszeit mit Isoproterenol 3 Min.. In der Tabelle sind nur die stimulierten cAMP-Spiegel angegeben, die Basalwerte lagen zwischen 1.6 und 1.9 pmol/ 10^5 Zellen. Bei Experiment 4 Inkubationsmethode 3.3.1., Inkubationszeit mit Hormonen 5 Min..

Exp. 1 - 3 :

<u>Äquilibrationszeit:</u>		<u>5 min.</u>	<u>12 min.</u>	<u>20 min.</u>
cAMP (pmol/ 10^5 Z)	Exp. 1	4.3	4.1	3.9
	2	4.5	4.3	4.0
	3		4.3	4.3

Exp. 4 :

<u>Äquilibrationszeit:</u>		<u>10 min.</u>	<u>60 min.</u>
cAMP (pmol/ 10^5 Z)			
Basal		1.7	1.7
Isoproterenol		7.0	5.6
Isoproterenol + Insulin		2.9	2.9

Tab. 4.2. Zellkonzentration im Inkubationsmedium und Höhe der cAMP-Spiegel unter maximaler Stimulation mit Isoproterenol

Zu 4 Verdünnungsstufen einer Fettzellsuspension wurde Isoproterenol ($10^{-6}M$) zugesetzt, und cAMP nach 5 Min. gemessen. Die Tabelle zeigt die bei den jeweiligen Zellkonzentration erreichten cAMP-Spiegel.

Fettzellen/ml cAMP (pmol/ 10^5 Z.)

1.6 x 10^5	8.5
1.3 x 10^5	8.0
1.0 x 10^5	8.0
2 x 10^4	90.

Tab. 4.3. Einfluß der Schüttelfrequenz auf cAMP-Spiegel und Lipolyse

a. cAMP (pmol/ 10^5 Zellen)

Hormone:	-	Isoprot. ($10^{-6}M$)	Isoprot. + Insulin 100 $\mu E/ml$	
<u>3.3.1.:</u>				(n)
120/min.	1.97 $\pm$ 0.27	7.9 $\pm$ 0.86	3.2 $\pm$ 0.2	(13)
200/min.	1.83 $\pm$ 0.17	10.1 $\pm$ 0.46	2.9 $\pm$ 0.3	(6)
<u>3.3.2.:</u>				
Magnetrührer	1.7 $\pm$ 0.12	4.2 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.2	(8)

b) Glycerinproduktion in Gegenwart von Isoproterenol $10^{-6}M$ (nMol/ 10^5 Zellen x 60 Min.)

<u>3.3.1.:</u>	
120/min.	337
200/min	377

Die Tabelle zeigt Mittelwerte aus Versuchen, die mit der Inkubationsmethode 3.3.1. bei unterschiedlich raschem Schütteln der Proben während der Inkubation durchgeführt wurden, und Mittelwerte aus Versuchen, die mit der Inkubationsmethode 3.3.2. durchgeführt wurden. Die Inkubationszeit betrug 5 Min. (3.3.1.), bzw. 4 Min (3.3.2.).

Tab. 4.4. Einfluß der Ca^{++} -Konzentration im Inkubationsmedium

Die Zellen wurden 5 Min. in Ca^{++} -Tris II Puffer bzw. EGTA-Tris II Puffer vorinkubiert, Kontrollproben wurden in Ca^{++} -u. EGTA-freiem Tris II Puffer inkubiert. cAMP-Spiegel wurden 2, 5 und 15 Minuten nach Zugabe der Hormone zum Inkubationsmedium bestimmt.

cAMP (pmol/10⁵ Z)

Hormone:	Isoprot. (10^{-6}M)	Isoprot. + Insulin 100 $\mu\text{E/ml}$
<u>Tris II Puffer</u>		
<u>Exp. 1</u> ohne Ca^{++} :	8.4	4.3
+ Ca^{++} 200 μM :	8.0	4.0
Inkubationszeit 2 Min.		
<u>Exp. 2</u> ohne Ca^{++} :	5.7	3.5
+ Ca^{++} 200 μM :	7.1	3.1
Inkubationszeit 15 Min.		
<u>Exp. 3</u> ohne Ca^{++} :	4.0	2.4
+ Ca^{++} 50 μM :	4.1	2.6
500 μM :	4.2	2.2
5 mM :	3.6	2.6
Inkubationszeit 15 Min.		
<u>Exp. 4</u> ohne EGTA :	6.0	4.6
+EGTA (1mM) :	6.2	4.6
Inkubationszeit 5 Min.		

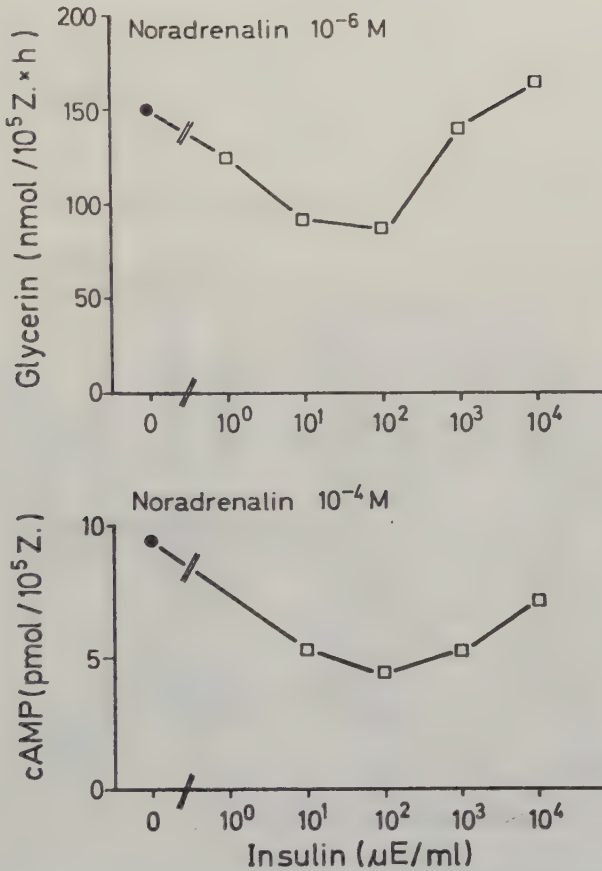
5. Wirkung von Rinder- und Puteninsulin auf cAMP-Spiegel und Lipolyse

5.1. Rinderinsulin

Für verschiedene Stoffwechselfparameter wie Glucoseoxydation, Lipogenese und Antilipolyse liegt der physiologische Dosiswirkungsbereich des Insulins an der Fettzelle bei ca. 1 - 100 μ E/ml. Entsprechend wurde die Wirkung von Insulin auf die cAMP-Spiegel und die Lipolyse in einem physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationsbereich von 10 μ E/ml bis 10 m E/ml untersucht. Während Insulin allein keinen Effekt auf die Basalwerte von cAMP und Lipolyse zeigte, war der Effekt in Gegenwart von Katecholaminen auf beide Stoffwechselfparameter signifikant. (Mittelwert der Differenzen von Isoproterenol (10^{-6} M) und Isoproterenol (10^{-6} M) + Insulin 100 μ E/ml bei 5 Min. Inkubation: Δ cAMP ($\text{pmol}/10^5$ Zellen) = $4.6. \pm 0.5$, ($T = 8.3$, $n = 16$, $P < 0.01$)).

Vergleicht man die Dosiswirkungskurve (Abb. 5.1.) von Insulin auf die Lipolyse, gemessen an der Glycerinproduktion pro Stunde, mit den cAMP-Spiegeln nach 5 Minuten Inkubation in Gegenwart von Noradrenalin, so zeigt sich, daß das Maximum beider Effekte bei einer Insulinkonzentration von 100 μ E/ml erreicht wird und sowohl die Lipolyse als auch cAMP-Spiegel um ca. 50 % reduziert werden. Es zeigt sich ferner in beiden Fällen eine paradoxe Umkehr des Effekts bei hohen Konzentrationen jenseits des physiologischen Bereichs. Beim Vergleich der Anfangskinetiken (Abb. 5.2.) der cAMP-Spiegel und der Lipolyserate in Gegenwart von Isoproterenol + Insulin fällt auf, daß nahezu konstanten Lipolyseraten keine konstanten cAMP-Spiegel entsprechen, was darauf hinweist, daß die Lipolyse nicht eine direkte Funktion des gesamten cAMP-Gehalts der Zelle zu jedem Zeitpunkt der Kinetik sein kann (siehe auch Diskussion Kap. 8.5.).

Abb. 5.1.

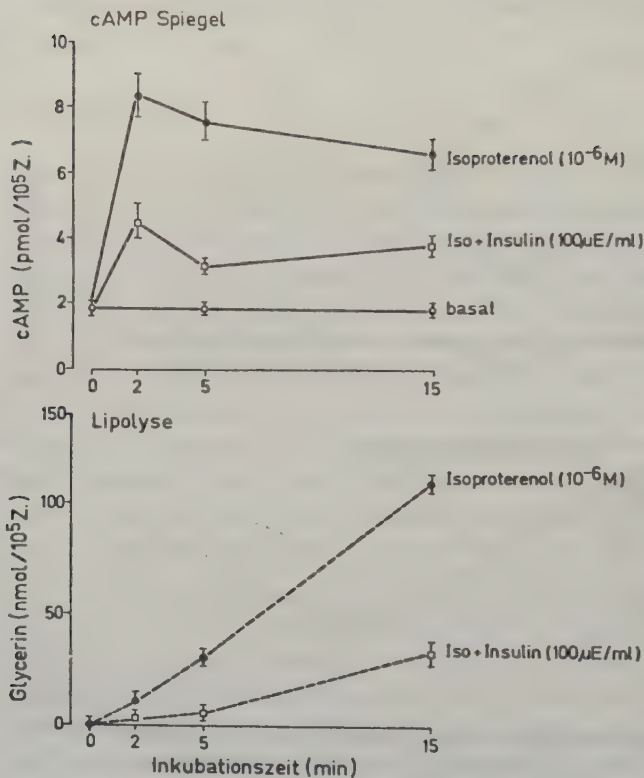


Der Insulineffekt auf Lipolyse und cAMP-Spiegel

Dosiswirkungskurve

Noradrenalin und Insulin wurden in den aus dem Diagramm ersichtlichen Konzentrationen zum Inkubationsmedium zugesetzt. Die cAMP-Spiegel wurden nach 5 Min., die Glycerinfreisetzung nach 60 Min. gemessen. Inkubationsbedingungen wie 3.3.1.

Abb. 5.2.

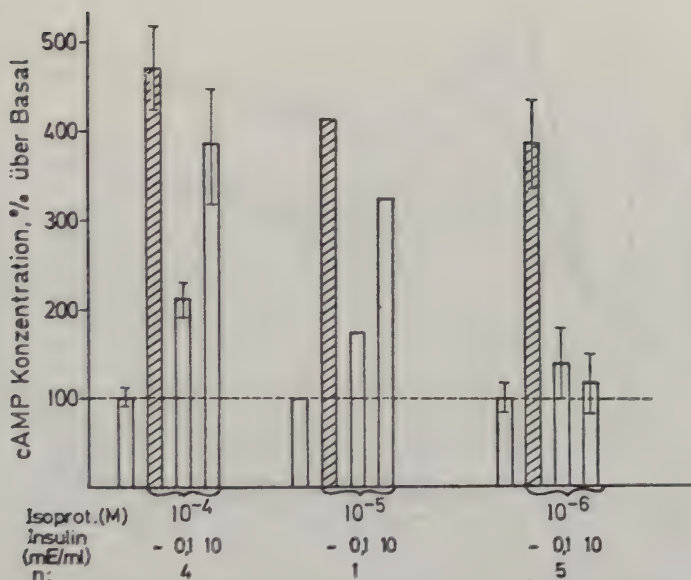


Der Insulineffekt auf Lipolyse und cAMP-Spiegel

Kinetik

Isoproterenol (10^{-6}M), bzw. Isoproterenol (10^{-6}M) + Insulin ($100\text{ }\mu\text{E/ml}$) wurden zum Zeitpunkt 0 zum Medium zugesetzt, cAMP und Glycerinfreisetzung wurden nach 2, 5 und 15 Min. gemessen. Die Punkte (●-● Iso., □-□ Iso + Insulin, ○-○ Kontrollen ohne Hormonzusatz) repräsentieren Mittelwerte aus 15 Versuchen, die senkrechten Balken entsprechen S.E.M. Inkubation wie 3.3.1.

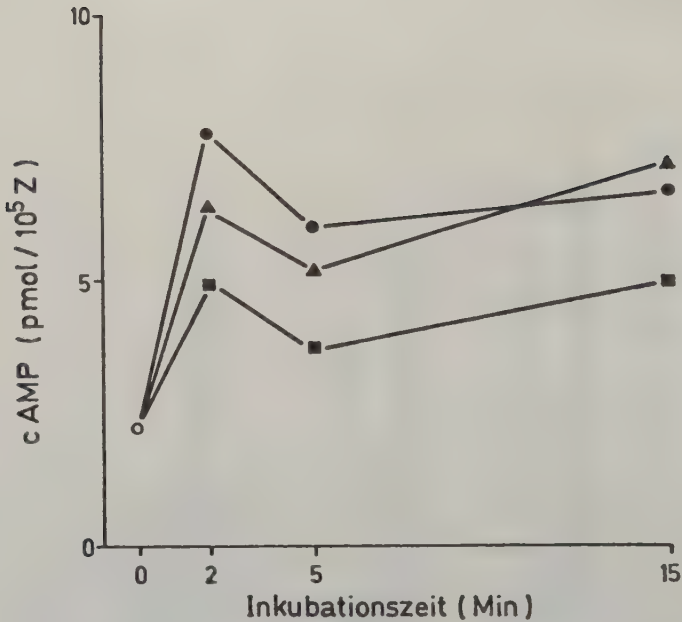
Abb. 5.3.



Effekt physiologischer und supraphysiologischer Konzentrationen von Insulin auf die cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol 10^{-4} M, 10^{-5} M und 10^{-6} M

Die cAMP-Spiegel wurden 5 Min. nach Zugabe von Iso., bzw. Iso. + Insulin zum Medium gemessen. Die schraffierten Säulen repräsentieren die cAMP-Stimulation bei alleiniger Zugabe von Iso. in den angegebenen Konzentrationen, die leeren Säulen repräsentieren die Stimulation bei Zusatz von Insulin 0,1 mE/ml, bzw. 10 mE/ml. Die senkrechten Balken entsprechen S.E.M bei der unter n: angegebenen Anzahl von Versuchen. Inkubation wie 3.3.1.

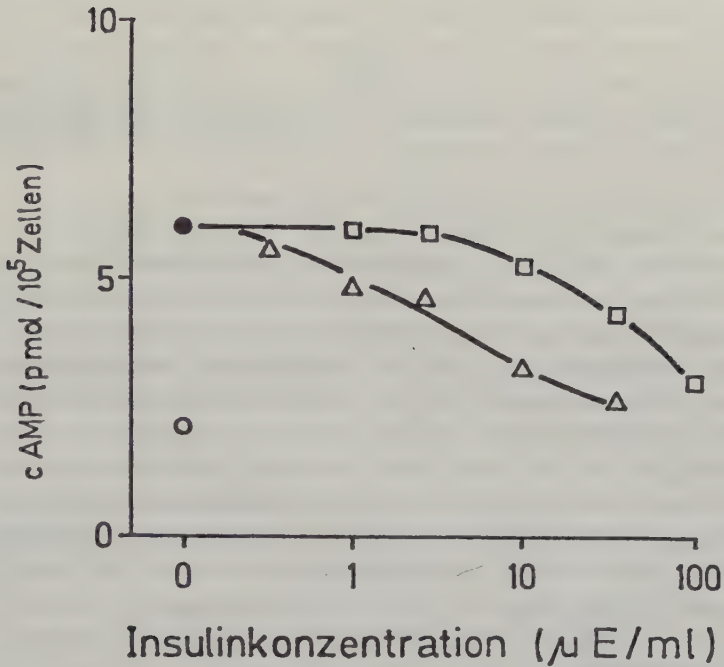
Abb. 5.4.



Kinetik der cAMP-Spiegel in Gegenwart physiologischer und supraphysiologischer Insulindosen

Die Punkte (●-● Isoproterenol (10^{-4} M), ■-■ Iso. + Insulin (100 µE/ml), ▲-▲ Iso. + Insulin (10 mE/ml) geben die cAMP-Spiegel 2, 5 und 15 Min. nach Hormonzugabe zum Medium an. Inkubation wie 3.3.1.

Abb. 5.5.



Wirkungsvergleich von Puten- und Rinderinsulin

Dosis-Wirkungskurve von Puteninsulin Δ - Δ und Rinderinsulin $\square$ - $\square$ in Gegenwart von Isoproterenol ($10^{-6}M$), o = Basal.
cAMP-Messung 5 Min. nach Hormonzugabe, Inkubation wie 3.3.1.

5.2. Paradoxyer Effekt unphysiologisch hoher Insulinkonzentrationen

Wie die Abb. 5.1. zeigt, nimmt bei Insulinkonzentrationen, die über der maximal wirksamen Konzentration von $100 \mu \text{ E/ml}$ liegen, sowohl der antilipolytische, als auch der cAMP-senkende Effekt von Insulin wieder ab. Interessant war, daß das Auftreten dieses paradoxen Insulineffekts auf die cAMP-Spiegel von der Konzentration des lipolytischen Hormons abhängig war, (45) und Abb. 5.3.

Die Umkehr des Insulineffekts auf die Lipolyse ist an Fettgewebe (46) und isolierten Fettzellen (47-52, 7) mehrfach beschrieben. Obwohl einige Untersucher diesen Insulineffekt an isolierten Fettzellen nicht finden (53, 9) stimmen neuere Arbeiten (50, 7) sowohl hinsichtlich Lipolyse als auch cAMP-Spiegeln mit unseren Ergebnissen überein. Der Vergleich der beiden Kurven spricht dafür, daß auch dieser Insulineffekt auf die Lipolyse isolierter Fettzellen durch eine entsprechende Regulation der cAMP-Spiegel vermittelt wird. Zum Mechanismus der Umkehr der normalen Insulinwirkung existiert bisher keine befriedigende Erklärung.

5.3. Puteninsulin

Puteninsulin besitzt gegenüber Rinderinsulin eine erhöhte biologische Aktivität (54-56), als deren Ursache durch Bindungsstudien am Insulinrezeptor von isolierten Fettzellen und Lebermembranen eine gegenüber Rinderinsulin auf das zehnfache erhöhte Affinität gefunden wurde (57). Es schien deshalb interessant zu untersuchen, ob auch eine verstärkte Wirkung auf die cAMP-Spiegel nachweisbar ist. Der Vergleich der Dosiswirkungskurven (Fig. 6.5.) der beiden Insuline ergibt bei niedrigen Konzentrationen eine größere Aktivität des Puteninsulins, wohingegen der Maximaleffekt

beider Insuline gleich stark ist. Es besteht also eine weitgehende Parallelität zwischen Affinität zum Membranrezeptor und der cAMP-senkenden Wirkung.

6. Wirkung von NSILA, Agmatin, und Adenosin auf cAMP-Spiegel und Lipolyse

6.1. NSILA - non suppressible insulin like activity

Die insulinähnliche Aktivität (ILA), die im Nüchternserum mit verschiedenen Testen bestimmt werden kann (58-60), läßt sich nur zu 5 - 10 % durch insulinspezifische Antikörper unterdrücken. Der überwiegende Teil der Aktivität wird als NSILA bezeichnet (59, 60) und kann durch spezifische Extraktionsmethoden in eine NSILA-S und eine NSILA-P-Fraktion aufgetrennt werden (61). Bei der gereinigten NSILA-S-Fraktion handelt es sich um ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 7 000 und einer spezifischen Aktivität von 430 m E/mg (60, 62). Untersuchungen mit teilweise gereinigter NSILA-S haben gezeigt, daß die Substanz in ihren Effekten auf Wachstum und Stoffwechsel weitgehend mit Insulin übereinstimmt (60,62,63) und außerdem (^{125}J)-Insulin an Lymphozyten, Fettzellen und Lebermembranen aus der Bindung zu verdrängen vermag, was auf einen gemeinsamen Membranrezeptor hinweist. An isolierten Fettzellen zeigt NSILA eine starke antilipolytische Wirkung (61, 64). Ebenso wie Insulin hemmt NSILA den durch lipolytische Hormone stimulierbaren Anteil der Adenylatzyklase in Fettzellghosts und Fettzellmembranen sowie in Membranpräparationen aus Mäuseleber, im Gegensatz zu Insulin wird aber auch die Basalaktivität der Zykase durch NSILA gehemmt (65, 66). Im Hinblick auf diese Effekte war auch eine Wirkung auf die cAMP-Spiegel anzunehmen.

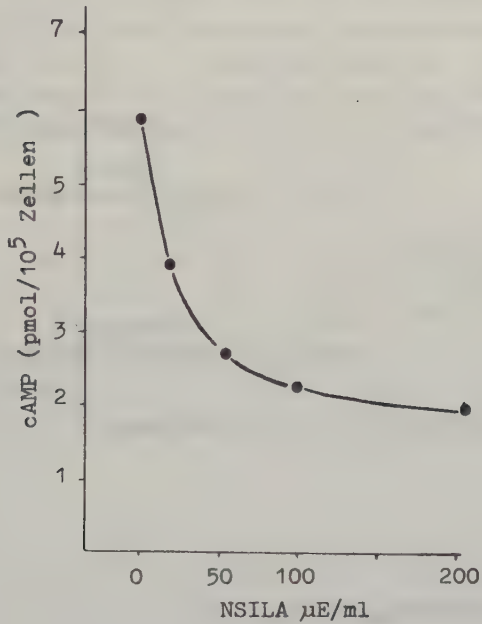
Die Wirkung einer partiell gereinigten Präparation von NSILA-S auf die cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol ($10^{-6}M$) wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 - 200 μ E/ml untersucht (Abb.6.1.). NSILA senkt schon bei einer Konzentration von 10 μ E/ml die cAMP-Spiegel deutlich, der Maximaleffekt wird bei 200 μ E/ml erreicht und ist ebenso stark wie der von Insulin. Die Kinetik des NSILA-Effekts (Abb.6.2.) entspricht den Insulin-Kinetiken. Es ist deshalb wahrscheinlich, daß der antilipolytische Effekt von NSILA ebenso wie der Insulineffekt über eine Senkung der cAMP-Spiegel vermittelt wird (67).

6.2. Agmatin

Untersuchungen an synthetischen Insulinvarianten (68) haben ergeben, daß der Argininrest B 22 des Insulins für die biologische Wirkung von Bedeutung ist. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet ergaben, daß Argininderivate und Agmatin (= decarboxyliertes Arginin) in vitro eine insulin-ähnliche Wirkung zeigen (69). An isolierten Fettzellen stimulieren Argininderivate und Agmatin die Glucoseoxydation und die Lipogenese und wirken stark antilipolytisch (70).

Es wurde nun untersucht, ob dieser antilipolytische Effekt des Agmatins auch mit einer cAMP-Senkung korreliert ist (Tabelle 6.1.). Es zeigt sich dabei erstaunlicherweise, daß die durch Isoproterenol induzierte Lipolyse zwar um ca. 30 % reduziert wurde, jedoch keine Senkung der cAMP-Spiegel durch Agmatin erfolgte. Die antilipolytische Wirkung des Agmatins scheint also nicht durch cAMP vermittelt zu werden.

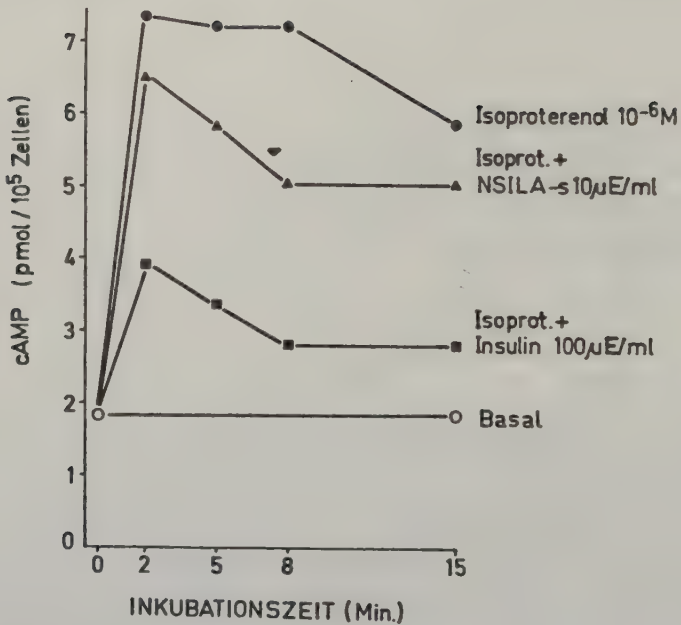
Abb. 6.1.



NSILA-Wirkung auf cAMP in Gegenwart von Isoproterenol

cAMP-Messung 5 Min. nach Hormonzugabe zum Medium, Isoproterenol 10^{-6}M , NSILA in den aus dem Diagramm ersichtlichen Konzentrationen. Inkubation wie 3.3.1.

Abb. 6.2.



Kinetik der NSILA-Wirkung auf cAMP in Gegenwart von Isoproterenol

Isoproterenol (10^{-6} M), bzw. Iso. (10^{-6} M) + NSILA (10 µE/ml), bzw. Iso. (10^{-6} M) + Insulin (100 µE/ml) wurden zum Zeitpunkt 0 zum Medium pipettiert, cAMP zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Inkubation wie 3.3.1.

Tab. 6.1. Agmatin

Effekt von Agmatin (5mM) auf die Lipolyse und die cAMP-Spiegel in isolierten Fettzellen in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M). Die cAMP-Spiegel wurden nach einer Inkubationszeit von 5 min., die Glycerinproduktion nach einer Inkubationszeit von 60 min. bestimmt. cAMP in $\text{pmol}/10^5$ Zellen, Glycerinproduktion in $\mu\text{mol}/10^5$ Zellen x 60 min.

	<u>Glycerin</u>	<u>cAMP</u>		
		Exp. 1	2	3
Basal	0.012	1.8	1.6	1.9
Isoproterenol	0.390	6.4	9.4	9.0
Isoproterenol				
+ Agmatin	0.266	6.6	9.1	8.9

6.3. Adenosin

Adenosin nimmt unter den hier untersuchten antilipolytisch wirksamen Substanzen insofern eine Sonderstellung ein, als es sich hierbei um einen Metaboliten der Fettzelle handelt (40). In Fettgewebe und isolierten Fettzellen wirkt exogen zugesetztes Adenosin antilipolytisch (71,72), gleichzeitig senkt es die cAMP-Spiegel (40,73). Neben einer Hemmung der basalen und hormonstimulierten Adenylatzyklase-aktivität in Fettzellghosts (73, 74) wird auch eine Hemmung der Phosphodiesterase in Fettzellhomogenaten gefunden (73).

Eine Rolle von Adenosin als physiologischer "Feedback-Inhibitor", der zur Vermeidung überschießender cAMP-Produktion auf Hormonreiz gebildet wird, wurde diskutiert (73). Obwohl eine Adenosinfreisetzung durch isolierte Fettzellen von Schwabe et al. beschrieben wurde (40), ist die physiologische Bedeutung unklar, da es sich nach den Daten dieser Gruppe um einen vom Hormonreiz und der Höhe der cAMP-Spiegel unabhängigen Prozeß handelt (40). In neueren Arbeiten wird eine Bedeutung von Adenosin für die Insulinwirkung an isolierten Fettzellen diskutiert (41,75). Bei diesen Untersuchungen senkte Insulin die cAMP-Spiegel nicht, wenn

- a) die Zellkonzentration im Inkubationsmedium gering und die cAMP-Konzentration hoch war.
- b) bei hoher Zellkonzentration und niedrigen cAMP-Spiegeln Adenosindesaminase im Inkubationsmedium anwesend war.

Aus diesen Befunden wurde geschlossen, daß Adenosin die Insulinwirkung begünstigt, wobei zwei Mechanismen in Frage kommen:

- a) Insulin wirkt bei hohen cAMP-Spiegeln nicht. Adenosin senkt die cAMP-Spiegel in einen Bereich, in dem Insulin wirkt.
- b) Adenosin ist direkt an der Insulinwirkung beteiligt.

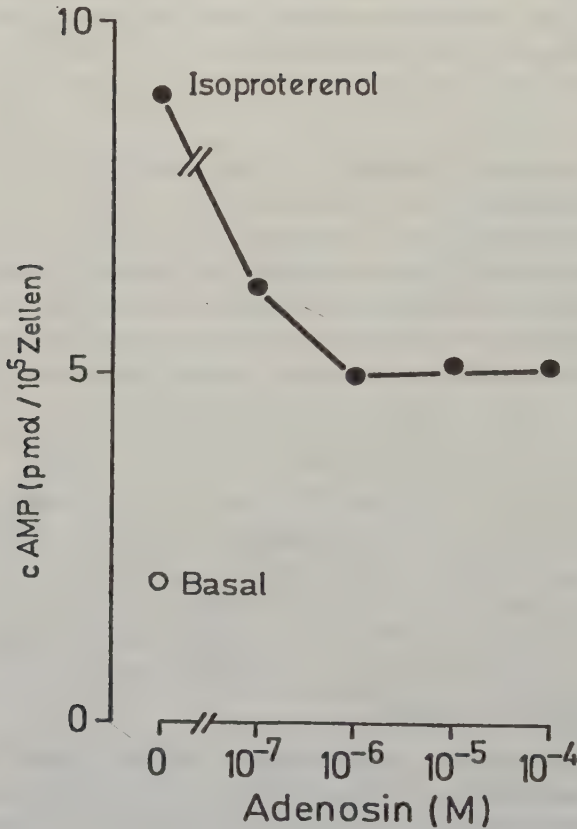
Im Gegensatz zu der hier diskutierten ersteren Möglichkeit zeigte Insulin bei unseren Messungen auch bei hohem cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) und Methylxanthinen einen Effekt auf die Spiegel (siehe auch Kap. 8.6.).

Die Wirkung von Adenosin wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-7} M bis 10^{-4} M untersucht (Abb. 7.3.). Der Maximaleffekt wird bei einer Konzentration von 10^{-6} M erreicht. Bei geringer Zellkonzentration im Inkubationsmedium ist der Adenosineffekt stärker ausgeprägt. In Gegenwart von Phosphodiesterase-Hemmern in maximalwirksamer Konzentration reduzierte Adenosin bereits in einer Konzentration von 10^{-7} M die cAMP-Bildungsrate deutlich stärker als Insulin (Abb. 6.4.). Auffällig war, daß bei Verwendung von Phosphodiesterase-Hemmern bei 10^{-6} M noch kein Maximaleffekt erreicht war. Ob hierbei eine durch die Phosphodiesterase-Blockierung verminderte endogene Adenosinbildung eine Rolle spielt, wäre zu untersuchen. Adenosin 10^{-7} M scheint den Insulineffekt auf die cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) (Abb. 6.5.) nicht selektiv zu verstärken, sondern lediglich das cAMP-Niveau aller Proben gleichmäßig zu senken.

Isoproterenol stimulierte cAMP-Spiegel, die durch Adenosin (10^{-5} M, in Abwesenheit von Phosphodiesterase-Blockern maximal wirkende Dosierung) reduziert sind, können dagegen durch Insulin 100 μ E/ml noch weiter gesenkt werden (Abb. 6.6.).

Die unterschiedliche Wirkungscharakteristik von Insulin und Adenosin in Gegenwart von Phosphodiesterase-Blockern (siehe Kapitel 7)), und die Addition der Maximaleffekte beider Substanzen sprechen nicht für einen gemeinsamen Ansatzpunkt, bzw. für eine gemeinsame Endstrecke.

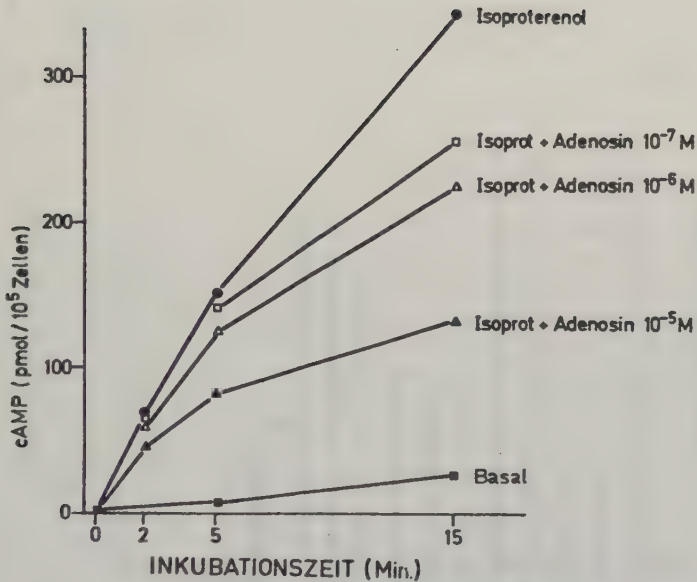
Abb. 6.3.



Adenosinwirkung auf cAMP in Gegenwart von Isoproterenol

cAMP wurde 5 Min. nach Zugabe von Isoproterenol (10^{-6} M) bzw. Iso. (10^{-6} M) + Adenosin in den angegebenen Konzentrationen zum Medium gemessen. Inkubation wie 3.3.1.

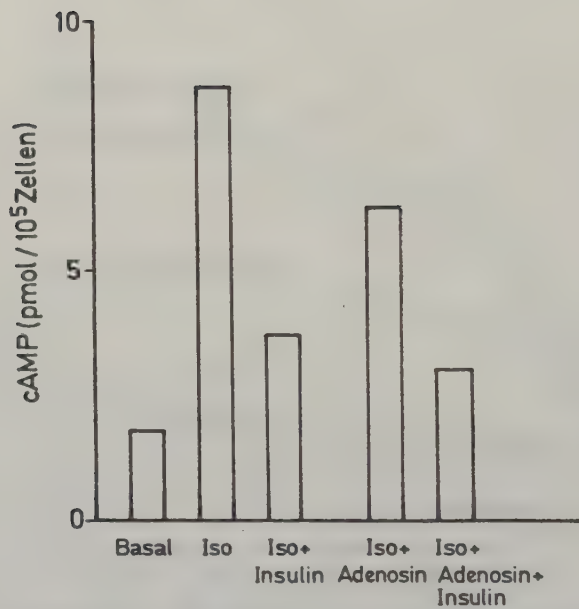
Abb. 6.4.



Adenosinwirkung auf die cAMP-Synthese bei Verwendung eines Phosphodiesterase-Blockers

Zum Zeitpunkt 0 wurde IBMX (2mM, siehe auch Kapitel 7.3.) allein (Basal), IBMX + Isoproterenol (10^{-6} M), bzw. IBMX + Iso. + Adenosin in den angegebenen Konzentrationen zum Medium pipettiert, und cAMP nach 2, 5 und 15 Min. gemessen. Inkubation wie 3.3.1.

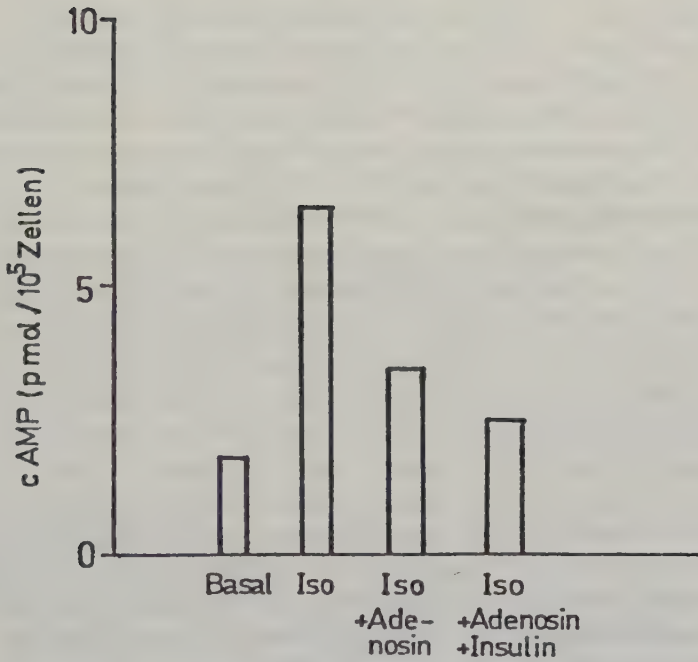
Abb. 6.5.



Einfluß von Adenosin auf den Insulin-Effekt

Isoproterenol 10^{-6} M, Insulin 100 μ E/ml, Adenosin 10^{-7} M. cAMP-Messung nach 5 Min. Inkubation wie 3.3.1.

Abb. 6.6.



Addition von Adenosin- und Insulineffekt bei der maximal wirkenden Dosis beider Substanzen

Isoproterenol 10^{-6} M, Adenosin 10^{-5} M, Insulin 100 μ E/ml.

cAMP-Messung nach 5 Min.. Inkubation wie 3.3.1.

7. Mechanismus der Insulinwirkung auf cAMP-Spiegel

Wie schon in der Einleitung dargelegt, werden zur Erklärung des Insulineffekts auf die cAMP-Spiegel in der Fettzelle zwei Mechanismen diskutiert; Hemmung der cAMP-Synthese an der Adenylatzyklase oder Stimulierung des cAMP-Abbaus durch die Phosphodiesterase. Auf beide Enzymsysteme sind Insulineffekte beschrieben: Auf die Adenylatzyklase im Antagonismus zu katabolen Hormonen am zellfreien System (15,16,76), auf die Phosphodiesterase nach Vorbehandlung der intakten Zellen (17 - 20, 53). Es ging nun darum, zu untersuchen wie weit diese an reduzierten Versuchssystemen gefundenen Insulineffekte für das komplexere System der intakten Zelle relevant sind.

Da die Insulineffekte, die an Zykklase und Phosphodiesterase beschrieben wurden, charakteristische Unterschiede der Anfangskinetiken aufweisen, für die intakte Zelle aber keine genauen Daten über den Verlauf des Insulineffekts unmittelbar nach Hormonreiz existieren, schien es wichtig, die Insulinanfangskinetiken in der intakten Zelle zu bestimmen. Es war jedoch von Anfang an klar, daß aus dem Vergleich der Kinetiken nur bedingt Aussagen über den spezifischen Angriffspunkt von Insulin in der cAMP-Regulation gemacht werden können, da in einem Versuchssystem, in dem beide cAMP-regulierenden Enzyme aktiv sind, Änderungen der cAMP-Spiegel nicht mit Sicherheit der Aktivitätsänderung eines Enzyms zugeschrieben werden können. Daher wurde unter Verwendung von Phosphodiesterase-Hemmern zum einen die cAMP-Synthese untersucht und der Insulin-Effekt auf die Syntheserate bestimmt, zum anderen unter Verwendung von Propranolol zur Hemmung der Adenylatzyklase der Einfluß von Insulin auf den cAMP-Abbau untersucht.

7.1. Anfangskinetik der Insulinwirkung auf die cAMP-Spiegel

Um die cAMP-Spiegeländerungen in Fettzellen unmittelbar nach Hormonzugabe zum Inkubationsmedium in sehr kurzen Zeitabständen messen zu können, wurde neben der bei allen bisherigen Versuchen verwendeten Technik (Methode 3.3.1.) die unter 3.3.2. beschriebene Inkubationstechnik angewandt, mit der cAMP-Messungen in 10 Sekundenintervallen bei exakt gleichen Bedingungen aller Proben möglich waren. Da, wie in Abschnitt 4.6. dargestellt, die Inkubationsbedingungen einen Einfluß auf die Höhe des cAMP-Spiegels haben, wurden zum Ausschluß von Artefakten Kinetiken bei zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen bestimmt (Abb. 7.1., 7.2.).

Hierbei löst Isoproterenol unmittelbar nach Zugabe zum Inkubationsmedium einen raschen Anstieg der cAMP-Konzentration aus, der nach ca. 1 Minute in ein Äquilibrium bzw. langsamen Wiederabfall der Spiegel übergeht. Während der Anfangsphase beträgt die Rate des cAMP-Anstiegs maximal $12 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times \text{Minute}$ (7.1) bzw. $5,5 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times \text{Minute}$ (7.2). Bei allen Versuchen unter Abb. 7.1 und Abb. 7.2 fiel ein kurzer zweiter Anstieg der cAMP-Spiegel bei 1,5 - 2 Minuten nach Reaktionsstart durch Isoproterenol auf, der signifikant war. Möglicherweise läßt sich diese Phase der Kinetik im Sinne einer Regelschwingung interpretieren, und läßt somit auf die Beteiligung eines Rückkoppelungsmechanismus bei der Einstellung des Plateaus der cAMP-Spiegel schließen (siehe auch Diskussion Kap. 8.2.).

Wenn Insulin gleichzeitig mit Isoproterenol zum Inkubationsmedium zugesetzt wurde, zeigte sich nicht sofort eine sichere Hemmung des Isoproterenol induzierten cAMP-Anstiegs. Erst nach ca. 0,5 - 1 Minute und Erreichen ca. halbmaximaler cAMP-Spiegel läßt sich ein deutlicherer Insulin-effekt nachweisen. Es erfolgt eine Hemmung des weiteren

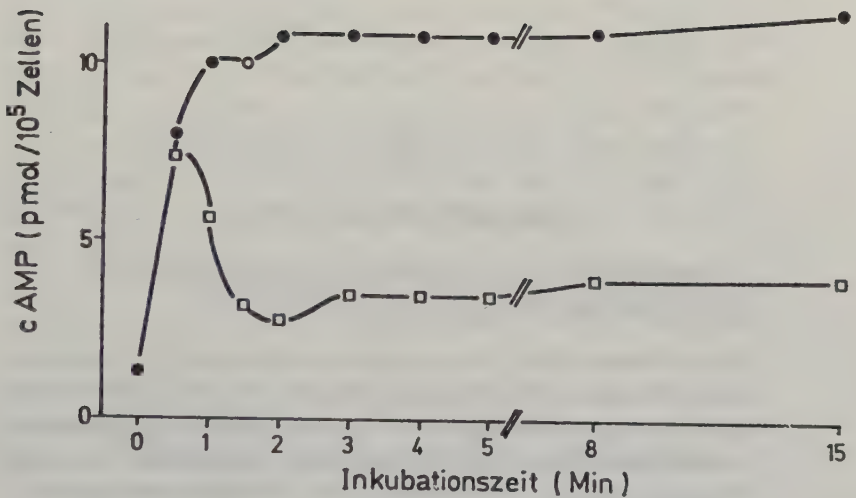
cAMP-Anstiegs und je nach Inkubationsbedingungen ein steiler oder langsamer Abfall der Spiegel. Ein Maximaleffekt wird bei 2 - 3 Minuten erreicht. Wie aus Abb. 7.2.a hervorgeht, ist der Insulineffekt als Tendenz schon nach 20 Sekunden vorhanden, statistisch läßt sich allerdings ein Unterschied erst nach 1 Minute sichern ($P < 0.01$).

Puteninsulin zeigt in der Anfangsphase gegenüber Rinderinsulin keinen verstärkten Effekt, führt jedoch zu einem steileren und tieferen Abfall der Spiegel.

Es stellt sich nun die Frage, ob das verzögerte Ansprechen der Zellen auf Insulin so zu interpretieren ist, daß das Überschreiten einer gewissen cAMP-Konzentration die Voraussetzung für das Einsetzen des Insulineffekts ist, oder ob die Vermittlung des Insulinsignals in der Zelle ein langsam ablaufender Prozeß ist, der jedoch unabhängig von der intrazellulären cAMP-Konzentration stattfindet. Zur Klärung dieser Frage wurden in Parallelansätzen Zellen 1 Minute lang mit Insulin inkubiert und dann erst wurde Isoproterenol zugegeben. Hierbei ergab sich jedoch keine veränderte Anfangskinetik. Dies und die Tatsache, daß Insulin keinen Effekt auf Basalspiegel zeigt, lassen schließen, daß für das Einsetzen des Insulineffekts eine gewisse cAMP-Konzentration, oder die Anwesenheit von Katecholaminen die Voraussetzung sind. Zur Charakterisierung des Insulineffektes in der intakten Zelle kann bisher also gesagt werden:

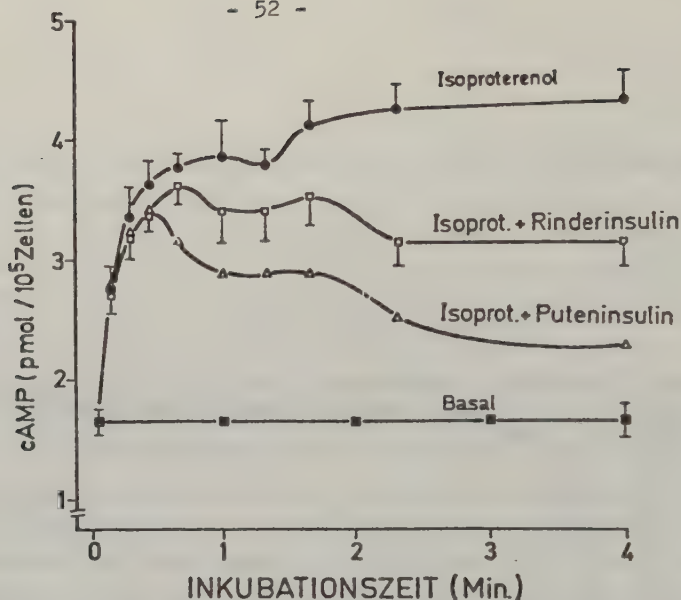
1. Insulin hat bei niedrigen cAMP-Spiegeln, bzw. in Abwesenheit von Katecholaminen keinen Effekt.
2. Eine sofortige deutliche Hemmung des cAMP-Anstiegs nach Isoproterenolstimulation läßt sich weder mit Rinderinsulin, noch mit dem stärker wirksamen Puteninsulin darstellen, es kommt jedoch in Gegenwart von Insulin früher zur Plateaubildung, bzw. zum Abfall der Spiegel.
3. Der Maximaleffekt wird nach ca. 2 Minuten erreicht.

Abb. 7.1.



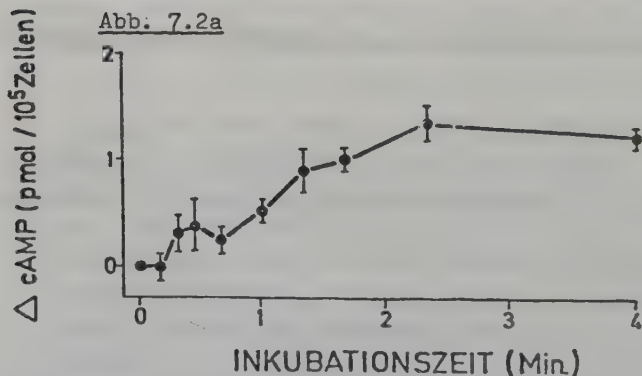
Anfangskinetik der cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol und Insulin

Isoproterenol ($10^{-6}M$) ●-●, bzw. Iso. ($10^{-6}M$) + Insulin (100uE/ml) □-□ wurden zum Zeitpunkt 0 zum Medium pipettiert und cAMP zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Inkubation wie 3.3.1.



Anfangskinetik der cAMP-Spiegel in Gegenwart von Isoproterenol, Rinder- und Puteninsulin

Isoproterenol $10^{-6}M$, Rinderinsulin $100\mu E/ml$, Puteninsulin $100\mu E/ml$. Die Hormone wurden zum Zeitpunkt 0 zum Medium pipettiert und cAMP zu den aus dem Diagramm ersichtlichen Zeitpunkten gemessen. Inkubation wie 3.3.2. Mittelwerte aus 8 Versuchen, die senkrechten Balken entsprechen S.E.M.



Effekt von Rinderinsulin dargestellt als Differenz ($\Delta cAMP$) von Isoproterenol- und Rinderinsulinkinetik. Die Punkte entsprechen den Mittelwerten der Differenzen bei $n = 8$, die senkrechten Balken entsprechen S.E.M.

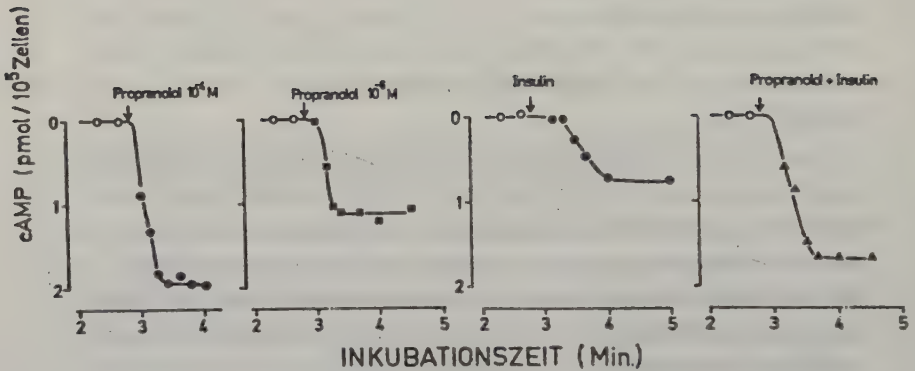
7.2. Insulineffekt auf den Abfall der cAMP-Spiegel in Gegenwart von Propranolol

Propranolol hemmt als Betablocker den Katecholamin stimulierbaren Anteil der Adenylatzyklaseaktivität, wogegen die Basalaktivität der Zykase unverändert bleibt (77). Nach neueren Untersuchungen (19) unterdrückt Propranolol auch den Effekt von Isoproterenol auf die "low- K_M -Phosphodiesterase" in Fettzellen. In isolierten Fettzellen fanden Manganiello et al. ein Absinken der Lipolyserate auf Null innerhalb von 2 Minuten nach Propranololgabe und einen gleichzeitigen Abfall der cAMP-Spiegel, wobei wegen der Schnelligkeit des Prozesses und der relativ langen Meßintervalle keine zeitliche Differenzierung beider Vorgänge möglich war. (6)

Es schien nun interessant zu untersuchen, ob in Gegenwart von Insulin der Abfall erhöhter cAMP-Spiegel, der nach Blockierung der durch Isoproterenol stimulierten cAMP-Synthese durch Propranolol erfolgt, beschleunigt abläuft. Ein beschleunigter Abbau in Gegenwart von Insulin ließe auf eine Erhöhung der Phosphodiesterase-Aktivität durch Insulin schließen.

In Vorversuchen wurde die Wirkung von Propranolol auf die Basalspiegel, und die Kinetiken des cAMP-Abfalls nach Propranololgabe (10^{-6} M, 10^{-4} M) in Gegenwart von Isoproterenol untersucht. Propranolol zeigte keinerlei Effekt auf die Basalspiegel. Der Abfall der durch Isoproterenol stimulierten cAMP-Spiegel nach Zugabe von Propranolol zum Inkubationsmedium erfolgt außerordentlich schnell. Auffälligerweise stellt sich ca. 30 Sekunden nach Propranololgabe bereits wieder ein neues Gleichgewicht ein.

Abb. 7.3.



Wirkung von Insulin auf Geschwindigkeit und Höhe des Propranolol induzierten cAMP-Abbaus

Isoproterenol (10^{-6} M) wurde zum Zeitpunkt 0 zum Inkubationsmedium zugesetzt und die Einstellung des neuen erhöhten cAMP-Gleichgewichts abgewartet. Zu den mit Pfeil gekennzeichneten Zeitpunkten wurde dann Propranolol (10^{-4} M), Propranolol (10^{-6} M), Insulin (100 μ E/ml) bzw. Propranolol (10^{-6} M) + Insulin (100 μ E/ml) zugesetzt und der cAMP-Abfall zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Inkubation wie 3.3.2.

Bei gleichzeitiger Zugabe von Insulin und Propranolol (Abb. 7.3.) fand sich keine weitere Beschleunigung des initialen cAMP-Abfalls gegenüber der Kontrolle, bei der Propranolol allein zugesetzt wurde. Dies spricht zunächst gegen eine sehr schnell erfolgende Aktivierung des cAMP-Abbaus durch Insulin. Bei einer Propranolol-Konzentration von 10^{-6} M führt Insulinzusatz zur Einstellung eines tieferen Plateaus. Bei Propranolol 10^{-4} M erfolgte kein weiteres Absinken des Plateaus bei Insulinzusatz. Der Mechanismus, der den sprunghaften Übergang vom Ausgangsäquilibrium der cAMP-Spiegel zu einer neuen Äquilibriumphase zugrundeliegt, soll in Kapitel 8.2. noch diskutiert werden.

7.3. Insulineffekt auf die cAMP-Synthese

Der Insulineffekt auf die Syntheserate von cAMP wurde in Fettzellen untersucht, deren cAMP-Abbau durch Methylxanthine blockiert wurde. Der Hemmeffekt von Methylxanthinen auf die Phosphodiesterase ist in der Literatur vielfach beschrieben (1, 78). Drei verschiedene Methylxanthine wurden getestet von denen Iso-Butyl-Methyl-Xanthin (IBMX) für die weiteren Versuche verwendet wurde, da mit dieser Substanz der gleiche Maximaleffekt wie mit Aminophyllin, jedoch bei fünffach niedriger Konzentration erreicht wurde.

Die Dosiswirkungskurve für IBMX (Abb. 7.6.) erreicht Maximaleffekte bei Konzentrationen größer als 1 mM. Halbmaximale Wirkung wird mit einer Konzentration von 0,35 mM erzielt. Die cAMP-Spiegel, die in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) und IBMX (3 mM) erreicht werden, liegen bei 200 pmol/ 5 Min. $\times 10^5$ Zellen und 400 pmol/15 Min. $\times 10^5$ Zellen, und damit wesentlich über den Spiegeln in Abwesenheit von Phosphodiesterase-Blockern, die bei maximal 10 pmol/ 10^5 Zellen nach 5 Min. Inkubationszeit liegen.

Im Gegensatz zur Kinetik der cAMP-Spiegel in Abwesenheit von Phosphodiesterase-Blockern, erfolgt hier keine Plateaubildung, sondern eine lineare cAMP-Produktion.

In Abwesenheit von Isoproterenol steigen unmittelbar nach Zugabe von IBMX zum Inkubationsmedium die bis zu diesem Zeitpunkt vollkommen konstanten Basalspiegel an (Abb. 7.4.). Die Rate der cAMP-Produktion beträgt unter Basalbedingungen $3,8 \text{ pmol/Min.} \times 10^5 \text{ Zellen} \pm 0,8 \text{ S.E.M. (n = 7)}$.

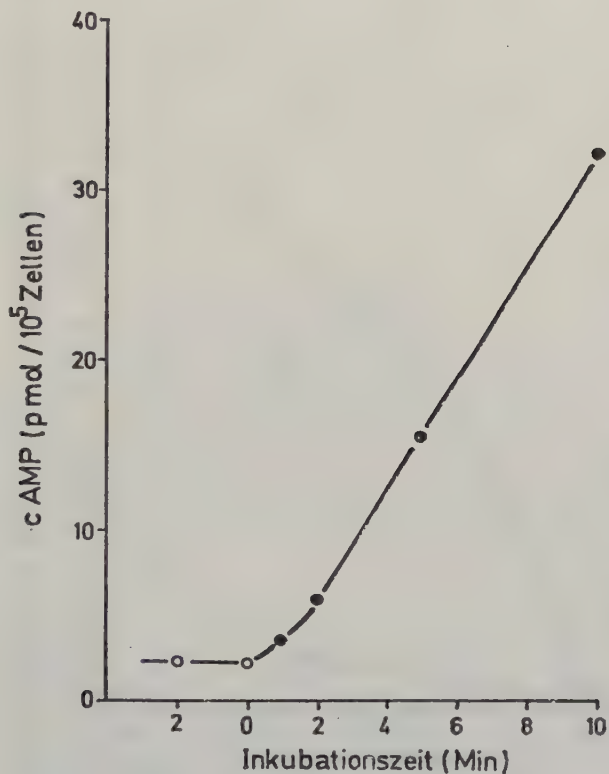
Die Isoproterenolzugabe erhöht die Rate der cAMP-Produktion auf das 10-fache ($38,9 \pm 3,4 \text{ pmol/10}^5 \text{ Zellen} \times \text{Min. n = 8}$). Diese Rate bleibt über 5 - 8 Minuten konstant und fällt dann bis zur 15 Minute um ca. 50 % ab (Abb. 7.5) (79.).

Während Insulin die cAMP-Basalspiegel in Abwesenheit von Katecholaminen nicht senkt, wird die cAMP-Synthese, die unter Basalbedingungen in Abwesenheit von Isoproterenol $3,8 \text{ pmol/Minute} \times 10^5 \text{ Zellen}$ beträgt, durch Insulin um $0,7 \text{ pmol/Minute} \times 10^5 \text{ Zellen} \pm 0,07 \text{ S.E.M. (n = 4, Paarvergleich für verbundene Stichproben)}$ reduziert. Dies spricht dafür, daß nicht die Anwesenheit von Katecholaminen, sondern die Höhe der cAMP-Spiegel eine Voraussetzung für einen Effekt von Insulin darstellt.

Der Insulineffekt auf die cAMP-Synthese in Gegenwart von Isoproterenol war stark vom Grad der Phosphodiesterase-Hemmung abhängig. In Abb. 6. ist die Beziehung von Phosphodiesterase-Hemmung und Insulineffekt dargestellt. Es ergibt sich ein deutlicher Antagonismus zwischen IBMX und Insulineffekt. In Gegenwart maximal wirkender IBMX-Konzentrationen senkt Insulin die cAMP-Bildung um 10 %, bei submaximal wirkenden IBMX-Konzentrationen steigt dieser Effekt bis auf maximal 70 % an.

Der Antagonismus zwischen Phosphodiesterase-Blockern und Insulin einerseits, der auch bei maximaler Blockierung der Phosphodiesterase vorhandene Insulineffekt andererseits, lassen schließen, daß Insulin die cAMP-Spiegel der Zelle sowohl über Regulation der Adenylatzyklase als auch der Phosphodiesterase senkt.

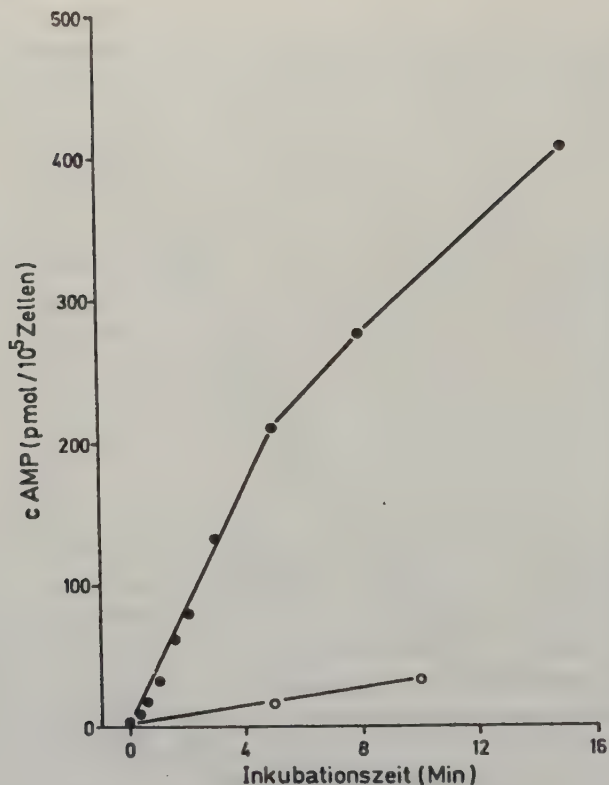
Abb. 7.4.



cAMP-Bildung bei Phosphodiesterase-Hemmung unter Basalbedingungen

IBMX (3mM) wurde zum Zeitpunkt 0 zum Inkubationsmedium zugesetzt. cAMP wurde zu den oben ersichtlichen Zeitpunkten vor und nach IBMX-Zugabe gemessen. Inkubation wie 3.3.1.

Abb. 7.5.

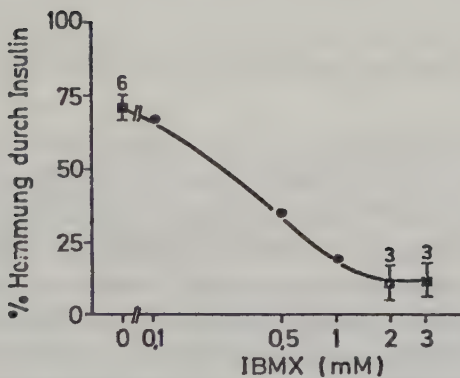
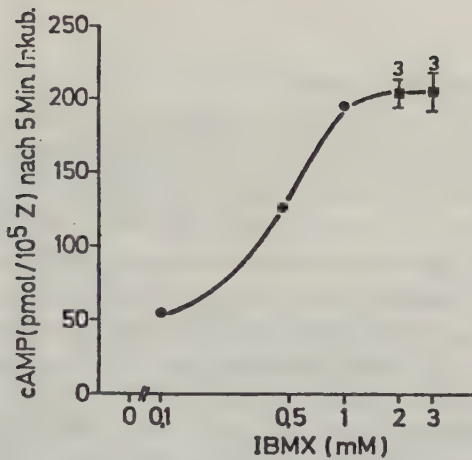


cAMP-Bildung bei Phosphodiesterase-Hemmung unter Basalbedingungen und in Gegenwart von Isoproterenol

IBMX (3mM) o-o, bzw. IBMX + Isoproterenol (10^{-6} M)

●-● wurden zum Zeitpunkt 0 zum Medium pipettiert und cAMP zu den im Diagramm ersichtlichen Zeitpunkten gemessen. Inkubation wie 3.3.1. Die cAMP-Messung bei 2 und 5 Min. wurde in 7 weiteren Versuchen wiederholt (siehe auch Abb. 8.1.).

Abb. 7.6.



Beziehung zwischen Phosphodiesterase-Blockierung durch IBMX (oben) und Insulineffekt in Gegenwart von Isoproterenol und IBMX (unten).

Oberes Diagramm: Dosis-Wirkungskurve von IBMX. IBMX in den angegebenen Konzentrationen und Isoproterenol (10^{-6} M) wurden gleichzeitig zum Medium zugegeben und cAMP nach 5 Min. gemessen. Inkubation wie 3.3.1. Die senkrechten Balken entsprechen S.E.M., die Zahlen entsprechen n.

Unteres Diagramm: Insulineffekt in Gegenwart von Isoproterenol und steigenden Mengen von IBMX. Der Insulineffekt ist als % Hemmung des Isoproterenoleffekts angegeben. cAMP-Messung unter den oben beschriebenen Bedingungen unter Zusatz von Insulin 100 μ E/ml.

8. Diskussion

8.1. cAMP-Synthese und Umsatzraten

Die Untersuchung der cAMP-Kinetiken in Gegenwart von IBMX im vorhergehenden Abschnitt zeigt, daß in Gegenwart von Hormonen, aber auch unter Basalbedingungen eine konstante cAMP-Synthese in der Zelle stattfindet. Die Rate der cAMP-Akkumulation, die bei maximal wirksamen Konzentrationen von IBMX (größer als 1mM) gemessen wird, entspricht unter der Annahme, daß tatsächlich eine Totalblockierung der Phosphodiesterase vorliegt, der cAMP-Syntheserate, d.h. der gesamten Adenylatzyklaseaktivität der Zellen. Durch Vergleich der cAMP-Kinetiken mit und ohne IBMX kann aus der Syntheserate auf den cAMP-Umsatz und die Höhe der cAMP-Abbauraten während der verschiedenen Phasen der cAMP-Kinetik geschlossen werden.

Abb. 8.1. zeigt den Vergleich der cAMP-Kinetiken mit (B) und ohne (A) IBMX.

A: Wie schon oben beschrieben, sind die cAMP-Spiegel unter Basalbedingungen ohne IBMX konstant. Die Kinetik des cAMP nach Zugabe von Isoproterenol zeigt eine erste kurze Phase des steilen cAMP-Anstiegs mit einer Rate $\frac{\Delta \text{cAMP}}{\Delta t}$ von maximal 12 pmol/Min. $\times 10^5$ Zellen der eine zweite Phase folgt, während der ein konstantes Gleichgewicht auf erhöhtem Niveau besteht. Anhand des Reaktionsschemas (Abb. 8.2.) des cAMP-Stoffwechsels kann die Kinetik interpretiert werden.

Aus Abbildung 8.2. läßt sich ableiten, daß die cAMP-Konzentration dann konstant ist, wenn Adenylatzyklaseaktivität und Phosphodiesteraseaktivität der Zelle gleich groß sind.

$$\Delta \text{cAMP} = 0, \text{ wenn } v_S = v_A$$

Voraussetzung für diese Annahme ist, daß der extrazelluläre cAMP-Anteil, der bei der hier verwendeten Versuchsanordnung mitgemessen wird, der aber wahrscheinlich durch die intrazelluläre Phosphodiesterase nicht abgebaut werden kann, klein gegenüber der Gesamtmenge cAMP ist. Außerdem wird angenommen,

daß der gebundene cAMP-Anteil im Gleichgewicht mit dem übrigen intrazellulären cAMP steht.

Änderungen der cAMP-Konzentration setzen voraus, daß eine Differenz zwischen Adenylatzyklaseaktivität und Phosphodiesteraseaktivität besteht,

$$\Delta \text{cAMP} < \text{ oder } > 0, \text{ wenn } v_S < \text{ oder } > v_A$$

wobei die Geschwindigkeit der cAMP-Konzentrationsverschiebung durch die Größe der Differenz zwischen Adenylatzyklase und Phosphodiesteraserate gegeben ist.

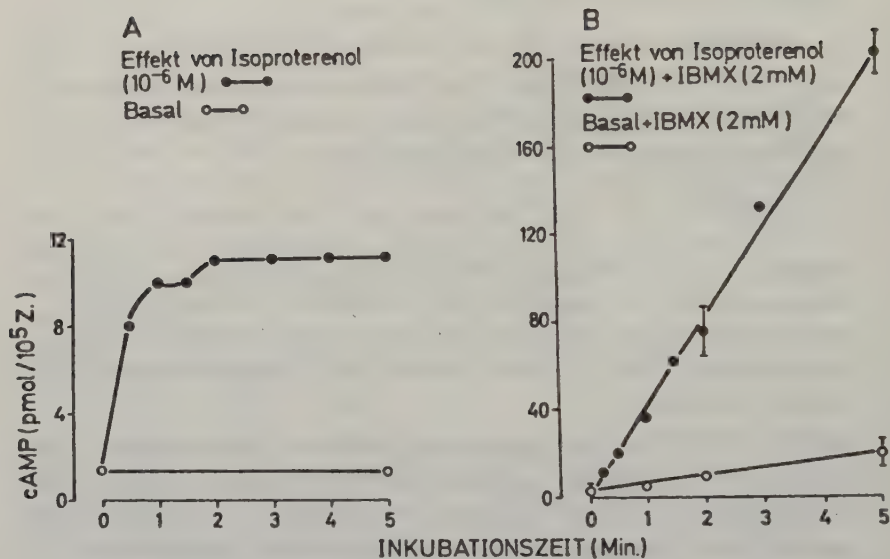
$$\frac{\Delta \text{cAMP}}{\Delta t} = v_S - v_A$$

Angewandt auf Kinetik A bedeutet dies, daß unter Basalbedingungen und in Gegenwart von Isoproterenol während der zweiten Phase der Kinetik, während der die cAMP-Konzentration konstant ist, Adenylatzyklase und Phosphodiesteraserate gleich groß sind.

Während der ersten Phase nach Zugabe von Isoproterenol ist die Adenylatzyklaserate größer als die Phosphodiesteraserate, die Differenz beträgt maximal $12 \text{ pmol/Min.} \times 10^5$ Zellen. Die nachfolgende Einstellung des Gleichgewichts setzt voraus, daß die Differenz wieder auf Null abfällt, also bis zum Beginn der zweiten Phase bereits wieder eine Hemmung der Adenylatzyklase eintritt, oder die Aktivität der Phosphodiesterase ebenfalls ansteigt, und dadurch cAMP-Synthese- und Abbaurate angeglichen werden.

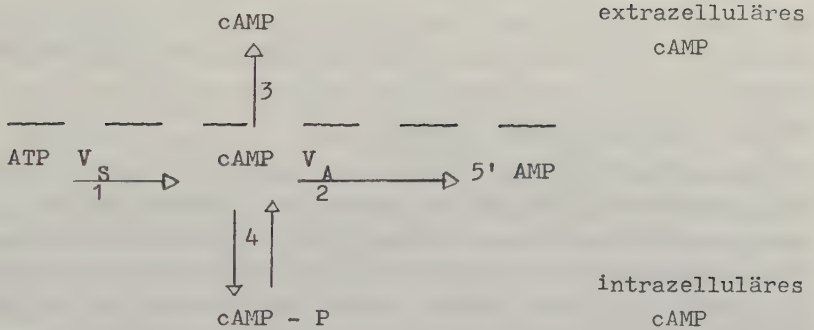
Während ohne Phosphodiesterasehemmung aus der Kinetik der cAMP-Spiegel nur auf das Verhältnis der Aktivitäten von Adenylatzyklase und Phosphodiesterase geschlossen werden kann, und keine Messung der absoluten Synthese und Abbaurate möglich ist, kann aus Kinetik B, die unter den gleichen Versuchsbedingungen wie Kinetik A, jedoch in Gegenwart von IBMX, bestimmt wurde, die absolute Syntheserate (v_S) während der verschiedenen Phasen der Kinetik entnommen werden.

Abb. 8.1.



Vergleich der cAMP Kinetiken mit (B) und ohne (A)
Phosphodiesterase-Hemmung

Abb. 8.2.



Reaktionsschema des cAMP-Stoffwechsels

- 1 Synthese durch die Adenylatzyklase
- 2 Abbau durch die Phosphodiesterase
- 3 Diffusion in den Extrazellulärraum
- 4 Bindung an die Proteinkinase

Unter Inkubationsbedingungen, unter denen in Abwesenheit von IBMX ein Gleichgewicht der cAMP-Spiegel besteht ($v_S = v_A$), entspricht die in Gegenwart von IBMX bestimmte Syntheserate auch der Abbaurrate, und damit dem cAMP-Umsatz.

Den Basalspiegeln liegt demnach ein Umsatz von $3,8 \pm 0,8$ pmol/Min $\times 10^5$ Zellen zugrunde, den in Gegenwart von Isoproterenol (10^{-6} M) erhöhten Spiegeln entspricht ein auf das zehnfache erhöhter cAMP-Umsatz.

Da die Syntheserate während mindestens 5 Minuten nach Zugabe von Isoproterenol zum Inkubationsmedium konstant bleibt, und zu dem Zeitpunkt, zu dem in Kinetik A die Einstellung des Gleichgewichts erfolgt, keinerlei Absinken der Rate zu beobachten ist, kann zunächst einmal geschlossen werden, daß diese Gleichgewichtseinstellung nicht durch Feedback-Hemmung der Adenylatzyklase - diese Möglichkeit wird im folgenden Abschnitt nochmals ausführlich diskutiert - sondern durch eine Erhöhung und Angleichung der Phosphodiesterase-aktivität an die Adenylatzyklaseaktivität zustandegekommen ist. Neben der Steigerung der Adenylatzyklaseaktivität durch Isoproterenol scheint also auch eine, wenn auch langsamere, Aktivierung der Phosphodiesterase zu erfolgen. Der Zeitpunkt, zu dem die Phosphodiesterase-Aktivierung beginnt, läßt sich aus der folgenden Überlegung ableiten:

Während der ersten Phase der cAMP-Kinetik A nach Hormonreiz beträgt die maximale Steigung $\frac{\Delta \text{cAMP}}{\Delta t}$ 12 pmol / Min $\times 10^5$

Zellen. Da die Syntheserate (Kinetik B) unmittelbar nach Isoproterenolreiz von $3,8$ pmol / Min $\times 10^5$ Zellen (Basalumsatz, $n = 7$) auf $38,8 \pm 3,4$ pmol / Min $\times 10^5$ Zellen ($n = 8$) ansteigt, die maximale Differenz zwischen Synthese und Abbaurrate aber nur 12 pmol / Min $\times 10^5$ Zellen beträgt, muß eine submaximale Phosphodiesterase-Aktivierung also sofort nach Hormonreiz erfolgen, da andernfalls ein wesentlich steilerer Initialanstieg der cAMP-Konzentration in Kinetik A

zu erwarten wäre. Isoproterenol aktiviert also direkt oder indirekt beide Enzyme des cAMP-Stoffwechsels.

8.2. Kontrolle des Äquilibrium der cAMP-Spiegel

Neben der äußerst schnellen Reaktion des cAMP-Systems auf Hormonreize (Kap. 7) ist auffällig, daß das System eine starke Tendenz besitzt sich nach Hormon-induziertem cAMP-Anstieg und -Abfall sehr schnell wieder zu stabilisieren, wobei dem neuen Äquilibrium meist eine kurze Schwankung der cAMP-Spiegel vorausgeht, die evtl. als Regelschwingung zu interpretieren ist (Abb. 7.1., 7.2.). (79)

Wie in Kapitel 8.1. dargelegt, scheint die für diese Stabilisierung notwendige Synchronisation von cAMP-Synthese und Hydrolyse durch eine Angleichung der Phosphodiesterase-Rate an eine veränderte Adenylatzyklaserate zustandezukommen. Fraglich ist nun, wie man sich den Mechanismus dieser Synchronisation vorstellen könnte. Nach den bisher in der Literatur existierenden Daten lassen sich hierfür 3 Hypothesen formulieren.

1. Adenylatzyklase und Phosphodiesterase werden direkt über Hormonreiz gleichsinnig gesteuert.
2. Die Synchronisation erfolgt durch cAMP, das die Rate eines Teils der Phosphodiesterase-Kapazität reguliert.
3. Die Synchronisation erfolgt über einen Rückkoppelungsmechanismus.

Zu 1

Die erste Hypothese stützt sich auf die schon zitierten Untersuchungen von Loten und Sneyd (17), Manganiello et al. (18) Zinman und Hollenberg (19) sowie Pawlson et. al. (20). In der Fettzelle kommen zwei Phosphodiesterasen vor, ein membrangebundenes Enzym mit niedriger K_M , und ein cytosolisches Enzym mit hoher K_M (17 - 20). Loten und Manganiello beschrieben einen stimulierenden Effekt von Insulin auf die Phosphodiesteraseaktivität. Zinman u. Pawlson fanden außerdem noch einen Effekt von Isoproterenol und Propanolol auf die Phosphodiesterase. Hierbei führte Isoproterenol wie Insulin zu einer gesteigerten Phosphodiesterase-Aktivität, der Katecholamineffekt konnte durch Propanolol gehemmt werden. Während Zinman und Pawlson Hormoneffekte nur an der Phosphodiesterase mit niedriger K_M erzielen konnten, beschreibt Loten auch eine Insulinwirkung am Enzym mit hoher K_M . Es stellt sich nun die Frage, wie die Hormonwirkung auf Adenylatzyklase und Phosphodiesterase charakterisiert sein muß, damit sie zu einer Interpretation der cAMP-Kinetiken ausreichend ist. Bereits unter basalen Bedingungen in Abwesenheit von Hormonen läßt sich ein cAMP-Umsatz bei konstantem cAMP-Spiegel nachweisen.

Die Spiegel springen als Folge der Isoproterenolwirkung von einem basalen Gleichgewicht auf ein erhöhtes Gleichgewicht, bzw. fallen als Folge von Insulin und Propanolol von einem höheren Gleichgewichtszustand auf einen niedrigeren. Wie in Kapitel 8.1. dargelegt, geht also ein Zustand, in dem Synthesegeschwindigkeit V_S und Abbaugeschwindigkeit V_A gleich sind ($V_{S1} = V_{A1}$) über ein Ungleichgewicht ($V_{S2} < \text{oder} > V_{A2}$) in ein neues Gleichgewicht ($V_{S3} = V_{A3}$) über. Soll nun die neue Gleichgewichtseinstellung nur durch

Hormonwirkung auf beide Enzyme erklärt werden, so sind zwei Charakteristika des Hormoneffekts Voraussetzung:

- a) die Hormonwirkung muß auf V_S und V_A gleichsinnig wirken, da ausgehend von $V_{S1} = V_{A1}$ der Zustand $V_{S3} = V_{A3}$ erreicht werden muß.
- b) die Hormonwirkung müßte V_S und V_A um den exakt gleichen Betrag verändern.

Versucht man nun das Verhalten der cAMP-Spiegel in Anwesenheit von Isoproterenol und Propranolol im Rahmen dieser Hypothese zu interpretieren, so ergeben sich bezüglich der ersten Bedingung keine prinzipiellen Widersprüche, da ja beide Substanzen auf Adenylatzyklase und Phosphodiesterase gleichsinnig wirken. Die Kinetik der cAMP-Spiegel nach dem Zusatz von Insulin zum stimulierten System läßt sich dagegen nicht in dieser Weise erklären. Da sowohl nach eigenen Messungen als auch nach Daten aus der Literatur Insulin die Adenylatzyklase hemmt (15,16,76), die Phosphodiesterase dagegen stimuliert (17-20), ist zwar der Übergang vom Gleichgewicht in ein Ungleichgewicht erklärbar, jedoch nicht der erneute Übergang in ein Gleichgewicht, es sei denn, man nimmt nur eine Dauer der Insulinwirkung von ca. 1/4 Minute an. Es scheint daher zumindest für die Insulinkinetik unwahrscheinlich, daß die Synchronisation von Synthese und Abbau allein durch die bekannten Hormoneffekte auf beide Enzyme erklärbar ist.

Zu 2

Auch die zweite Hypothese leitet sich aus den eben zitierten Arbeiten ab. Demnach existieren ja in der Fettzelle zwei Phosphodiesterase-Systeme, die sich bezüglich ihrer Michaeliskonstanten und ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden. Die Michaeliskonstante des membrangebundenen Enzyms liegt in einem Bereich von 0,3 - 0,8 μM (17, 19),

diejenige des cytosolischen Enzyms in einem Bereich von 27-41 μM (17).

Unter der Voraussetzung, daß die intrazellulären cAMP-Spiegel im Bereich erster Ordnung der Reaktionskinetik des Enzyms mit hoher K_M liegen, und damit die Phosphodiesterase-Rate limitieren würden, könnte die cAMP-Konzentration selbst als Synchronisationsfaktor für Adenylatzyklase und Phosphodiesterase wirken. In diesem Falle hätte nämlich ein Ansteigen der Adenylatzyklaserate über die Phosphodiesteraserate durch den Anstieg des cAMP-Spiegels solange ein Ansteigen der Rate der Phosphodiesterase mit hoher K_M zur Folge, bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt hätte. Der gleiche Vorgang gilt auch für eine Hemmung der Adenylatzyklaserate.

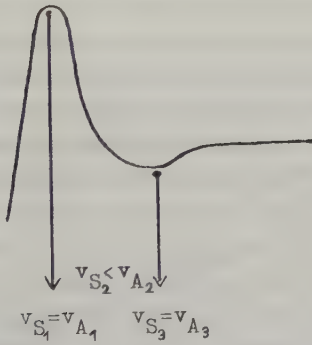
Die Kinetiken in Gegenwart von Isoproterenol und Propranolol lassen sich mit dieser Hypothese gut interpretieren, wobei diese sogar wahrscheinlicher als die erste Hypothese ist; die Hormonwirkung auf Synthese und Abbau müßte nämlich nicht das gleiche Ausmaß haben, da ja die Synchronisation durch die Abhängigkeit der Phosphodiesterase von cAMP erfolgt. Die Interpretation der Insulinkinetik erfolgt am einfachsten anhand der Abbildung 8.3.

Bei Punkt 1 setzt die Insulinwirkung ein. Die Adenylatzyklase wird gehemmt, die Phosphodiesterase aktiviert, wobei laut Zinman und Hollenberg nur eine Erhöhung der $V_{\max}$ der Phosphodiesterase mit niedriger K_M , laut Loten auch eine Erniedrigung der K_M des Enzyms mit hoher K_M erfolgt. Schon eine dieser drei Insulinwirkungen genügt, um eine Differenz von V_S und V_A zu bewirken und zum Abfall der cAMP-Spiegel zu führen. Der Abfall der cAMP-Konzentration führt nun wiederum zum Absinken der Rate der Phosphodiesterase mit hoher K_M , damit einem Wiederabsinken der Gesamt-Phosphodiesterase-Aktivität, somit zu einer Annäherung an die Adenylatzyklaserate.

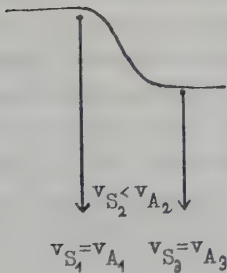
Abb.8.3.

Verhältnis von cAMP-Synthese- und Abbauraten (v_S und v_A) während der verschiedenen Phasen der Insulinkinetik (Kinetiken schematisch aus Abb.7.1. und 7.2.).

siehe Abb.7.1.



siehe Abb.7.3.



Zwischen Punkt 1 und Punkt 2 wäre demnach die Gesamt-Phosphodiesterase-Aktivität zunächst durch den Hormonreiz auf Kosten der Phosphodiesterase mit niedriger K_M oder beider Enzyme angestiegen, dann mit fallenden cAMP-Spiegeln durch den Rückgang der Rate der Phosphodiesterase mit hoher K_M wieder abgefallen.

Zu 3

Als weitere Möglichkeit einer Synchronisation käme die Bildung eines "Feedback-Inhibitors" in Frage, durch den die Adenylatzyklase gehemmt würde. Betrachtet man die Regulation des cAMP-Stoffwechsel im Zusammenhang mit dem Energiehaushalt der Fettzelle (siehe auch unten), so wäre dies ökonomischer als eine Nachregulierung der Phosphodiesterase, die ja zu einem erhöhten cAMP-Umsatz und ATP-Verbrauch führt. Andererseits ermöglicht der hohe Umsatz erst eine rasche Regulation der cAMP-Konzentration, wie sie z.B. nach Gabe von Propranolol zu beobachten war. Ob nun das Prinzip einer ökonomischen ATP-Verwertung oder die schnelle Regulierbarkeit für die Funktion der Fettzelle im Rahmen des Gesamtorganismus wichtiger ist, ist schwer zu beantworten.

Gegen eine rasch wirkende Rückkoppelung spricht zunächst einmal die lineare cAMP-Produktion in Gegenwart von IBMX (Kap. 7.3.).

Zieht man jedoch in Betracht, daß die Rückkoppelung über einen Metaboliten von cAMP erfolgen könnte, dessen Bildung durch die Blockierung der Phosphodiesterase mit Methylxanthinen unterbunden wird, so können unsere Ergebnisse einen auf die Adenylatzyklase wirkenden negativen Feedback nicht zweifelsfrei ausschließen.

Die Bildung einer Substanz, die die Wirkung lipolytischer Hormone auf die cAMP-Bildung hemmt, wurde zum erstenmal von Manganiello et al. (6) und von Ho und Sutherland (42) beschrieben. Bei den Untersuchungen von Ho und Sutherland nahm der Effekt von ACTH, Glukagon und Noradrenalin auf die cAMP-Konzentration bei wiederholten Gaben, bzw. nach Inkubation der Zellen mit d-b-cAMP, stetig ab. Ein voller Effekt war jedoch nach Austausch des Inkubationsmediums wieder erzielbar. Hieraus wurde geschlossen, daß isolierte Fettzellen auf Hormonreiz und cAMP-Anstieg einen Hormon-Antagonisten bilden, und in das Inkubationsmedium abgeben. Da hierbei 6 Min. nach der ersten hormonellen Reizung noch ein ca. 50 %-iger, und erst nach 9 Min. überhaupt kein Hormoneffekt mehr beobachtet wurde, scheint die Bildung dieses nicht näher charakterisierten Hormon-Antagonisten relativ langsam zu erfolgen.

In neueren Untersuchungen wurde eine mögliche Rolle von Adenosin als "Feedback-Inhibitor" diskutiert (siehe Kapitel 6.3.). Adenosin, das in der Zelle auch als Metabolit von cAMP entsteht, hemmt die cAMP-Synthese und senkt die cAMP-Spiegel in isolierten Fettzellen (Kapitel 6.3.). Auch eine Hemmung der Phosphodiesterase durch Adenosin wurde beschrieben (73). Fain et al. (73) postulierten daher, daß die hormonelle Stimulation des cAMP-Umsatzes und der Anstieg der cAMP-Konzentration zu einer verstärkten Bildung von Adenosin führen könnten, das seinerseits wieder hemmend auf den cAMP-Umsatz rückwirken würde. Eine solche Adenosinbildung durch isolierte Fettzellen in einer Menge, die zur Hemmung der cAMP-Synthese ausreichend ist, wurde von Schwabe et al. (40) nachgewiesen. Da in diesen Untersuchungen Adenosin unabhängig von Hormonreizen gebildet wurde, wurde eine Beteiligung von Adenosin an einem Feedback für unwahrscheinlich erachtet.

In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen von Hepp et al. (15) an der Adenylatzyklase interessant, bei denen eine lineare cAMP-Produktion auch dann gefunden wurde, wenn der cAMP-Abbau nicht durch Methylxanthine gehemmt wurde. Dies spricht absolut gegen die rasche Bildung einer Feedback-Substanz. Allerdings lassen sich diese an Fettzell-ghosts gewonnenen Ergebnisse nicht unbedingt auf die Verhältnisse der intakten Zelle übertragen.

Die Daten aus der Literatur lassen es also eher unwahrscheinlich erscheinen, daß bei der raschen Gleichgewichtseinstellung nach dem Anstieg der cAMP-Spiegel ein Feedback-mechanismus eine Rolle spielt. Wahrscheinlich steht jedoch zumindest die von Ho et al. beschriebene Substanz im Zusammenhang mit dem langsamen Absinken (Abb. 5.2.) der cAMP-Spiegel, das ca. 15 Minuten nach dem ersten Anstieg von cAMP zu beobachten ist.

Bei einer rein qualitativen Betrachtung liefert also die zweite Hypothese am ehesten ein in sich schlüssiges Modell der schnellen cAMP-Regulation. Es muß nun untersucht werden, wie weit dieses Modell quantitativen Überlegungen standhält.

Hier interessiert zunächst die Frage, wie sich die cAMP-Konzentrationen in der Zelle und die Michaeliskonstanten der Phosphodiesterasen zueinander verhalten. Die cAMP-Konzentrationen in der Wasserphase (86) der Zelle bewegen sich zwischen 6 und 25 μM , die Michaelis-Konstanten der beiden Phosphodiesterasen liegen bei 0,3-0,8 μM ("low K_M -Phosphodiesterase"), und bei 27-41 μM ("high- K_M -Phosphodiesterase"). Demnach liegen die cAMP-Spiegel im Bereich nullter Ordnung der Reaktionskinetik der "low- K_M -Phosphodiesterase", und im Bereich erster Ordnung der Reaktionskinetik der "high- K_M -Phosphodiesterase". Es ist hierbei aber fraglich ob die cAMP-Konzentrationen, die ohne Berücksichtigung einer möglichen Kompartimentierung berechnet wurden, als am Enzym vorliegende Substrat-Konzentrationen angesehen werden können.

Kalkuliert man die Aktivitäten der beiden Enzyme nach den Daten von Zinman, Pawlson, Loten und ihrer Mitarbeiter, so ergeben sich $V_{\max}$ -Raten von ca. 10,2 (19), bzw. 9.9 (20) pmol cAMP/ 10^5 Zellen x Minuten für das "low- K_M -Enzym", und von ca. 70 pmol cAMP/ 10^5 Zellen x Minuten (17) für das "high- K_M -Enzym", sowie eine Aktivitätssteigerung der "low- K_M -Phosphodiesterase" durch Isoproterenol (19) um ca. 30 %. Einerseits liegt also die $V_{\max}$ allein schon des "low- K_M -Enzyms" deutlich über der Rate, die für das Zustandekommen des basalen Gleichgewichts zu erwarten ist, andererseits ist die Stimulierung der Phosphodiesterase-Rate durch Isoproterenol wesentlich kleiner als die Stimulierung der cAMP-Synthese und kann somit nicht allein das Gleichgewicht auf erhöhtem Niveau ermöglichen. Es liegt daher nahe, daß zumindest unter Basalbedingungen auch die an der "low- K_M -Phosphodiesterase" als Substrat vorliegende cAMP-Konzentration sich im Bereich der Michaeliskonstante des Enzyms bewegt, und die Aktivität unter Basalbedingungen durch das Substratangebot limitiert ist. Die unterschiedliche Stimulationsrate von cAMP-Synthese und -Abbau erfordert neben der hormonellen Steuerung des Abbaus zusätzliche Regulationsmechanismen. Die oben diskutierte Regulation des cAMP-Abbaus über cAMP selbst, das durch das Substratangebot die Rate der "high- K_M -Phosphodiesterase" reguliert, wäre bei einer $V_{\max}$ von ca. 70 pmol/ 10^5 Zellen x Minuten prinzipiell ein möglicher Mechanismus, eine genaue Kalkulation der durch den cAMP-Anstieg verursachten Erhöhung der Phosphodiesterase-Rate ist jedoch nicht möglich. Zinman und Hollenberg und Pawlson und Mitarbeiter beschreiben auch eine Erhöhung der $V_{\max}$ der "low- K_M -Phosphodiesterase" durch cAMP um 24 %. Wie der Katecholamineffekt ist auch dieser Effekt klein und betrifft nur die Aktivität der "low- K_M -Phosphodiesterase". Möglicherweise sind alle drei Mechanismen am Zustandekommen des Äquilibriums beteiligt.

8.3. cAMP-Syntheseraten in der intakten Zelle -- Vergleich mit in vitro gemessenen Raten der Adenylatzyklase

Die cAMP-Syntheseraten in der intakten Zelle liegen mit $39 \text{ pmol/min} \times 10^5 \text{ Zellen}$ (Kap. 7.3.) deutlich über den an Membranfraktionen unter gleichen Stimulationsbedingungen gemessenen Aktivitäten der Adenylatzyklase (siehe Anhang).

Zwei Erklärungen liegen nahe:

1. in unserem Versuchssystem besitzen die zur Hemmung der Phosphodiesterase verwendeten Methylxanthine selbst eine stimulierende Wirkung auf die Adenylatzyklase. Die Bildung eines die Zykase hemmenden cAMP-Metaboliten wird durch die Methylxanthine unterbunden.
2. Die maximale Adenylatzyklaseaktivität ist an die Intaktheit der Zelle gebunden und in Versuchssystemen, die mit zerstörten Zellen arbeiten, ist nur noch eine Teilaktivität vorhanden. Dies scheint die wahrscheinlichere Hypothese zu sein, da sich gegen die erstere Möglichkeit die folgenden Einwände vorbringen lassen:
 - a) Die initiale cAMP-Bildungsrate liegt auch ohne Hemmung der Phosphodiesterase wesentlich über den Zykaseraten.
 - b) Auch bei einem Teil der Adenylatzyklasemessungen wurden Methylxanthine zur Hemmung der Phosphodiesterase verwendet (80). Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht von Adenylatzyklasemessungen, die ohne Hemmung der Phosphodiesterase durchgeführt wurden.
 - c) Auch die Phosphodiesterase-Raten liegen weit über den für die Adenylatzyklase gefundenen Raten (siehe Anhang).

8.4. cAMP-Umsatz --- ATP-Umsatz

Der ATP-Umsatz der Fettzelle wurde von Hepp u.a. (81) durch Bestimmung des (^{32}P) Einbaus in die Mononukleotide der Fettzelle gemessen, und beträgt danach $120 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times \text{Min.}$ bzw. $70 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times \text{Min.}$ in Gegenwart von Isoproterenol. Während die cAMP-Spiegel mit ca. $8 \text{ pmol}/10^5 \text{ Zellen} \times \text{Min.}$ weit unter den ATP-Spiegeln der Fettzelle liegen (siehe Anhang), wird bei Stimulation der Zelle mehr als 50 % der ATP-Produktion für den intrazellulären Transport der hormonellen Information verbraucht.

8.5. Metabolisch aktives und inaktives cAMP

Die kausale Verknüpfung von lipolytischem Hormonreiz am Rezeptor der Zellmembran, cAMP, Aktivierung der Proteinkinase, Aktivierung einer Triglyceridlipase, und Glycerin-freisetzung ist durch zahlreiche Untersuchungen belegt (Steinberg et al., 1975,83). Für die Aktivierung der Proteinkinase durch cAMP wird folgender Mechanismus als wahrscheinlich angesehen: Die Proteinkinase der Fettzelle besteht, wie von Brostrom (84) zum erstenmal vermutet, aus einer regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit. Liegt die Proteinkinase als Komplex aus regulatorischer und katalytischer Einheit vor, ist sie inaktiv. cAMP bindet die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase und führt damit zur Freisetzung einer aktivierten katalytischen Untereinheit, die nun wiederum das Lipasesystem der Fettzelle aktiviert. Der Konzentrationsbereich, in dem cAMP die Aktivität von Proteinkinase aus Fettzellhomogenaten reguliert, lag bei Untersuchungen von Corbin et al. (85) bei $1-40 \times 10^{-8} \text{ M.}$ Kalkuliert man die cAMP-Konzentration in Fettzellen unter der Voraussetzung, daß cAMP nur in der Wasserphase der Fettzelle, die ca. 5 % des gesamten Zellvolumens ausmacht (86), vorliegt, so ergeben sich Konzen-

trationen von ca. $6 \mu\text{M}$ unter Basalbedingungen bis zu maximal $25 \mu\text{M}$ unter Isoproterenoleinfluß. Nähme man an, daß das gesamte intrazelluläre cAMP im Gleichgewicht mit der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase stünde, so wäre dann bereits unter Basalbedingungen eine maximale Aktivierung der Proteinkinase zu erwarten. Das bedeutet, daß also nur ein kleiner Teil des intrazellulären cAMP metabolisch aktiv sein kann. In diesem Sinne läßt sich auch die in Kapitel 5 dargelegte Beobachtung interpretieren, wonach Katecholamine und Insulin zwar parallele Wirkungen auf cAMP und Lipolyse besitzen, wonach jedoch keine fixe Beziehung zwischen der Höhe der cAMP-Spiegel und der Höhe der Lipolyserate besteht. Während nämlich die cAMP-Konzentration nach Katecholamin-induziertem Anstieg wieder abfällt, bleibt die Lipolyserate im gleichen Zeitraum konstant (siehe Abb. 5.2.). Das Fehlen einer konstanten Relation von cAMP und Lipolyse liesse sich für Katecholamine allein evtl. durch die Annahme erklären, daß hierbei die cAMP-Konzentration sich in einem Bereich befindet, der über der zur maximalen Aktivierung der Proteinkinase notwendigen Konzentration liegt, und dadurch Schwankungen der cAMP-Konzentration nicht unmittelbar zu einer Dissoziation des Komplexes von cAMP und regulatorischer Untereinheit führen müssen, da cAMP ja im Überschuß vorliegt. In Gegenwart von Insulin dagegen muß angenommen werden, daß die erniedrigte Lipolyserate dadurch zustande kommt, daß nur ein Teil der regulatorischen Untereinheiten an cAMP gebunden ist, d.h. daß cAMP in einem Bereich vorliegt, in dem es ~~ratenlimitieren~~ für die Proteinkinase-Aktivität und Lipolyse ist. In diesem Bereich aber müßten sich Schwankungen der cAMP-Spiegel dann auch in Schwankungen der Lipolyseraten ausdrücken. Dies ist jedoch nicht der Fall. Mithin ist es unwahrscheinlich, daß das in dieser Arbeit gemessenen cAMP insgesamt mit der Proteinkinase reagieren kann, d.h. metabolisch aktiv ist.

Man muß daher annehmen, daß in der Zelle nur ein kleiner metabolisch aktiver, und ein größerer inaktiver "cAMP-Pool" existiert. Da als Ursache hierfür ein Verlust größerer Mengen von cAMP in dem Extrazellulärraum ausscheidet - nach 10-minütiger Inkubation mit Isoproterenol befinden sich nur ca. 10 % des cAMP extrazellulär - dürfte die Erklärung wohl in erster Linie in einer Bindung des inaktiven Teils an Zellstrukturen oder ungleiche Verteilung in Zellkompartimenten vermutet werden.

8.6. Insulin

In der Einleitung wurde schon erwähnt, daß die zentrale Bedeutung von cAMP für die antilipolytische Wirkung des Insulins nicht unangezweifelt blieb, da zwar mehrere Untersuchungen die zuerst von Butcher et al. (5) beobachtete cAMP-senkende Wirkung des Insulins bestätigten, andererseits aber auch andere Untersucher eine Antilipolyse ohne gleichzeitigem Abfall des cAMP fanden (10 - 12). Die gute Korrelation der Insulineffekte auf cAMP und Lipolyse in Abb. 5.1. und 5.2. spricht nun wieder für einen Zusammenhang von cAMP-senkender und antilipolytischer Wirkung des Insulins. Es bleibt jedoch die Frage, warum auch ohne cAMP-Senkung eine deutliche Hemmung der Lipolyse erzielt werden konnte. Eine mögliche Erklärung läge evtl. darin, daß Veränderungen des biologisch aktiven cAMP-Anteils vor dem Hintergrund eines größeren inaktiven Anteils verschwinden, bzw. sich im Gesamtpool nur als kleine Schwankung bemerkbar machen könnten. In Betracht zu ziehen ist auch, daß neben cAMP noch andere Mechanismen an der Übertragung des Insulinsignals beteiligt sind. Diskutiert wird eine solche Funktion von cGMP und Ca^{++} .

Cuatrecasas et al. (13) fanden an isolierten Fettzellen der Ratte eine Stimulierung der cGMP-Spiegel durch Insulin und cholinerge Substanzen, die mit der cAMP-Senkung korreliert war. Eine solche antagonistische Beeinflussung der cAMP und der cGMP-Konzentrationen durch cholinerge Substanzen und Insulin wurde auch an anderen Geweben beschrieben (85), und führte zu der Hypothese einer engen Verbindung des Stoffwechsel der beiden Nukleotide. Für eine solche Verbindung diskutiert Cuatrecasas zwei Mechanismen. Einmal könnte es sich um zwei Adenylatzykласen handeln, von denen nur die eine durch Insulin gesteuert wird, während die zweite durch den Nukleotidspiegel reguliert wird, oder es existiert nur ein Zyklasesystem mit unterschiedlich Affinität zu ATP und GTP, Insulin erhöht die Affinität zu GTP, was die Utilisation von ATP zu Gunsten von GTP verringert, und damit zu cAMP-Abfall und cGMP-Anstieg führt. Welche Relevanz cGMP tatsächlich für die Lipolyseregulation besitzt, ist jedoch noch weitgehend unklar, da nach neueren Untersuchungen von Fain et al. (14) Noradrenalin gleichsinnig wie Insulin auf die cGMP-Spiegel in Fettzellen wirkt. Auf eine evtl. Bedeutung von Ca^{++} für den antilipolytischen Insulineffekt wurde in neuerer Zeit durch Kissebah et al. (12) hingewiesen. Kissebah et al. fanden, daß die cAMP-abhängige Stimulation von Proteinkinase aus menschlichem Fettgewebe durch steigende Konzentration von Ca^{++} unterdrückt werden kann. Da diese Untersucher nur eine geringe Beeinflußbarkeit der cAMP-Konzentration durch Insulin festgestellt hatten, sahen sie in einer Beeinflussung der Ca^{++} -Spiegel durch Insulin einen wahrscheinlicheren Mechanismus des antilipolytischen Insulineffekts. Im Gegensatz hierzu blieb bei den Untersuchungen von Fain et al. (14) der antilipolytische Insulineffekt auch in Ca^{++} -freien Inkubationsmedien erhalten, während der Insulineffekt auf die cGMP-Spiegel nicht mehr nachzuweisen war. Es ist weiterhin nicht

auszuschließen, daß auch mehrere parallele Mechanismen an der Insulinwirkung auf die Lipolyse beteiligt sein könnten. Die zweite Frage im Zusammenhang mit der Insulinwirkung, die den Angriffspunkt von Insulin im cAMP-Stoffwechsel der Zelle betrifft, scheint durch den Antagonismus von Insulin-effekt und Phosphodiesterase-Hemmung einerseits, den auch bei maximaler Phosphodiesterase-Hemmung verbleibenden Insulineffekt andererseits (Kapitel 7.3.), im Sinne eines Insulinangriffs sowohl an Synthese als auch Abbau beantwortet zu sein. Damit ist die Bedeutung der an Adenylatzyklase und Phosphodiesterase isoliert gefundenen Insulineffekte für den cAMP-Stoffwechsels der intakten Zelle bestätigt (79). Hierbei scheint die Beziehung Insulinwirkung - Phosphodiesterase-Hemmung auf einen größeren Anteil der Phosphodiesterase am Gesamtinsulineffekt hinzuweisen. Eine solche Interpretation kann jedoch durch einige Einwände in Zweifel gezogen werden. Der erste Einwand bezieht sich auf die schon oben diskutierte Möglichkeit, daß bei zunehmender Phosphodiesterase-Hemmung evtl. die Bildung einer Substanz, die auf die Adenylatzyklase hemmend wirkt, unterdrückt wird. Dabei würden sich dann zwei Effekte, Insulineffekt und Enthemmung an der Zykase überlagern, mithin einen kleineren Insulineffekt an der Adenylatzyklase vortäuschen. Folgender weiterer Einwand könnte ebenfalls angeführt werden: Wenn, wie Fain et al. (73) und Schwabe et al. (41) annahmen, Adenosin ein notwendiger Kofaktor der Insulinwirkung ist, könnte ein abnehmender Insulineffekt bei zunehmender Phosphodiesterase-Hemmung auch mit einer möglichen Abnahme der Adenosinbildung zusammenhängen. Hiergegen spricht aber zweierlei: Die Untersuchung des Insulin-effekts im Zusammenhang mit Adenosin in dieser Arbeit (Kapitel 6.3.) ergab keinen Anhaltspunkt für eine Kooperation beider Substanzen. Und: Auch bei Annahme einer solchen Kooperation, dürfte diese unsere Ergebnisse nicht beeinflussen, da unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen

(hohe Zellzahl und Vorinkubation vor Phosphodiesterase-Hemmung) die nach der Ansicht dieser beiden Autoren notwendige Adenosinmenge im Inkubationsmedium vorhanden ist. Sehr schwer ist auch zu beurteilen, wie sich die durch die Verwendung von Phosphodiesterase-Blockern bedingte starke Erhöhung der cAMP-Konzentration auf die Beteiligung der verschiedenen Phosphodiesterasen, evtl. auch cGMP abhängiger Phosphodiesterasen, am cAMP-Abbau auswirkt. Es ist daher nicht möglich, aus Abb.7.6. auf ein Überwiegen des Insulinangriffs an der Phosphodiesterase am Gesamteffekt des Insulins zu schließen.

Interessant war die Beobachtung, daß bei basalen cAMP-Konzentrationen keine Insulinwirkung festzustellen ist, bzw. eine Insulinwirkung erst nach Anstieg von cAMP in Gegenwart von Isoproterenol oder IBMX einsetzt. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Untersuchungen an der Adenylatzyklase, bei denen Insulin ebenfalls keine Hemmung der Basalaktivität bewirkte (15). Bei Messungen der "low- K_M -Phosphodiesterase" in Fettzellhomogenaten ist dagegen auch ein Insulineffekt sichtbar, wenn Zellen zuvor mit Insulin allein inkubiert wurden. (17-20). Die Tatsache, daß diese Phosphodiesterase-Aktivierung bei basalen cAMP-Spiegeln kein Absinken der Spiegel auslöst, ist evtl. ein Hinweis, daß das "low- K_M -Enzym" am Basalumsatz nicht teilnimmt, oder, wie auch schon oben vermutet, mit einer deutlich unter V_{max} liegenden Rate arbeitet. Eine weitere Frage die sich hieraus ergibt, ob evtl. cAMP für die Insulinwirkung am Rezeptor der Zykase wichtig ist, müßte untersucht werden.

9. Zusammenfassung

An isolierten Fettzellen der Ratte wurde die Wirkung verschiedener Hormone und Pharmaka auf cAMP-Konzentration und Lipolyse untersucht. Noradrenalin und Isoproterenol induzierten einen unmittelbaren und deutlichen Anstieg von cAMP und Lipolyse, Insulin reduzierte beide Effekte deutlich. Die vorliegende Arbeit bestätigt damit die zentrale Rolle von cAMP im Wirkungsmechanismus des Insulins auf die Fettzelle. Auch NSILA und Adenosin senkten die cAMP-Konzentration, während Agmatin trotz deutlicher antilipolytischer Wirkung die cAMP-Spiegel unbeeinflusst ließ.

Insulin zeigte keinen Effekt auf cAMP-Basalspiegel: offenbar sind erhöhte cAMP-Konzentrationen Voraussetzung für einen Insulineffekt. Berechnungen aus den vorhandenen Daten lassen darauf schließen, daß Hormoneffekte auf die Lipolyse wahrscheinlich nur durch einen kleinen Anteil des Gesamt-cAMP der Zelle vermittelt werden.

Basalen und stimulierten cAMP-Spiegeln liegen konstante cAMP-Umsätze zugrunde, die höher sind, als nach den Adenylatzyklasemessungen in Membranpräparationen zu vermuten war. Sie entsprechen bis zu 60 % des ATP-Umsatzes der Zelle.

Isoproterenol und Insulin steuern den cAMP-Umsatz durch eine gleichzeitige Wirkung an den Systemen von Adenylatzyklase und Phosphodiesterase. Die hormonelle Steuerung der Phosphodiesterase-Aktivität erfolgt sekundär über cAMP im Sinne einer raschen Aktivierung, jedoch besteht zusätzlich noch eine Regulation der durch verschiedene Michaeliskonstanten differenzierten Phosphodiesterase-Einheiten durch das Substratangebot.

10. Anhang: Daten aus der Literatur über cAMP-Spiegel, ATP-Umsatz, Adenylatzyklase und Phosphodiesterase in Fettzellen

Zur Umrechnung der verschiedenen Konzentrationsmaßeinheiten wurden folgende Daten nach Salans (89) und Hepp (80) verwendet:

10^5 Zellen entsprechen 11 mg TG

10^5 Zellen entsprechen 60 μ g Protein

1gTG entsprechen 1g Zellen

8-10 % des Fettzellproteins ergibt "ghost" Protein

10.1. Vergleichbare Daten über cAMP-Spiegel

pmol/ 10^5 Zellen

Desai (7):	cAMP (pmol/g Fett),		
	Basal	130	1.4
	N-Adrenalin (10 μ g/ml)	350	3.9
	+Insulin	-10 bis -30%	
Ho (42):	cAMP (nmol/gFett),		
	Basal	0.4 $\pm$ 0.06	4.4
	N-Adrenalin(3.5 x 10 $^{-7}$ M)		
	+Koffein (0.7mM)	20.4	225
	+Insulin		
Wieser (41):	cAMP (nmol/g Fettzellen)		
	Basal	1.74	1.9
	N-Adrenalin (1.5 x 10 $^{-7}$ M)	14.77	16.1
	+Insulin	-50 %	

pmol/10⁵ Zellen

Kono (51):	cAMP (nmol/gFettzellen)		
	Basal	0.1 bis 0.2	1.7
	N-Adrenalin (10 ⁻⁶ M)	0.7	7.7
Siddle (9):	cAMP (nmol/gFettz., trocken)		
	Basal	0.2.	2.3
	N-Adrenalin (0.55x10 ⁻⁶ M)	0.6.	6.9
	+Insulin 50µE/ml	0.4	4.6
Manganiello: (6)	cAMP (nmol/g Fett)		
	Basal	0.45	4.9
	N-Adrenalin (1.4x10 ⁻⁶ M)	1.2	13.2
	+Insulin	1.0	11.0
Schwabe (25):	cAMP (pmol/10 ⁵ Zellen)		
	Basal	1.85	
	N-Adrenalin (10 ⁻⁶ M)	49.6	
Butcher (5):	cAMP (pmol/g Fett, trocken)		
	Basal	400	4.7
	N-Adrenalin (5.5.x10 ⁻⁶ M)		
	+Koffein (1mM)	11 000	130.
	+Insulin	6 000	70.
Kho0 (3):	cAMP (pmol/mg Protein)		
	Basal	8.5	0.5
	N-Adr. (0.5x10 ⁻⁶ M)	22,1-45	1.4-2.8
	+Insulin 50 µE/ml	20.2	1.25

10.2 ATP-Spiegel

Hepp (53) :	ATP (nmol/10 ⁵ Zellen)	1.34 ± 0.22	
	nach 60 Min.	1.19 ± 0.31	
	+Ins. 50 µE/ml	1.44 ± 0.37	
	+N-Adr. (0.1 µg/ml)	0.68 ± 0.29	
	N-Adr. + Ins.	1.08 ± 0.41	
	ATP (nmol/g Fettgew.)	58.1 ± 5	
			<u>nmol/10⁵ Zell.</u>
Angel (82):	ATP (nmol/g Fettz.)	110 ± 3.9	ca. 1.21
	+N-Adr. (10 ⁻⁶ M)	98 ± 6.0	ca. 1.08
	60 Mi. Inkubation bei konst.		
	niedriger FFA-Konz. im Medium		
Bihler (88):	ATP (nmol/g Fettz., trocken)		
		60 - 70	ca. 0,7
Schwabe (75):	ATP (nmol/10 ⁵ Zellen)	0.9	
	30 Min. :		
	+Ins. 100 µE/ml	0.94	
	+N-Adr. (10 ⁻⁶ M)	0.31	
	N-Adr. + Insulin	0.37	
Knight (44):	ATP (nmol/g Fettge- webe)	109. ± 5	ca.1.2

10.3 ATP-Umsatz

Hepp (81): Einbau von (^{32}P) in Mononukleotide, davon
65 % in ATP ($\mu\text{Atome } (^{32}\text{P}) 10^8 \text{ Zellen} \times 60 \text{ Min.}$)

Basal	7.46 ca. 125	$\text{pmol}/10^5$
N-Adr. ($0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$)	4.13 ca. 70	Zellen $\times$ Min.
Insulin $100 \mu\text{E}/\text{ml}$	14.82 ca. 250	
N-Adr. + Insulin	10.36 ca. 170	

10.4. Adenylatzyklase-Raten

Renner (76): cAMP (nmol/g Gostprotein $\times$ Min.)

Basal	99 $\pm$ 15	ca. 1.5	$\text{pmol}/10^5$
N-Adr. (10^{-6}M)	243 $\pm$ 27	ca. 3.3	Zellen $\times$ Min.

Harwood (90): cAMP (nmol/g Ghostprotein $\times$ Min.)

Basal	49	ca. 0.7	$\text{pmol}/10^5$
N-Adr.	80	ca. 1.1	Zellen $\times$ Min.

10.5. Phosphodiesterase, $V_{\max}$ und K_M Werte

Loten (17) cAMP (pmol/g Fett, trocken) pmol/10⁵ Zellen x Minute

1- K_M -PDE :	K_M 0.88 μ M	$V_{\max}$ 1700	
+Ins. 100 μ E/ml	0.87	2640	
h- K_M -PDE :	K_M 41 μ M	$V_{\max}$ 6860	ca. 70
+Ins. 100 μ E/ml	27 μ M	$V_{\max}$ 6830	

Zinman (19) cAMP (pmol/g Fett)

1- K_M -PDE :	K_M 0.3 μ M	$V_{\max}$ 588, 892	
+ Ins.	unverändert	1351	
+ Isoproterenol	unveränd.	740	ca. 10

Pawlson (20) μ Units/mg Protein

1- K_M -PDE :	K_M 0.39 μ M	$V_{\max}$ 52 bis 160	
			ca. 10

11. Literaturverzeichnis

1. Cyclic AMP, Hrsg. G.A. Robinson, R.W. Butcher,
E.W. Sutherland, Academic Press (1971), Kap. 7 - 10 .
2. Steinberg, D., Huttunen, J.K., Adv.Cyclic Nucleotide
Res. 1, 47 - 62, (1972) .
3. Khoo, J.C., Steinberg, D., Thompson, B., Mayer, S.E., J.
Biol.Chem. 248, 3823 - 3830, (1973) .
4. Physiologische Chemie von Harper, H.A., Löffler, G.,
Petrides, P.E., Weiss, L., Springer-Verlag (1975), S.346.
5. Butcher, R.W., Baird, C.E., Sutherland, E.W., J. Biol.
Chem. 243, 1705-1712, (1968) .
6. Manganiello, V.C., Murad, F., and Vaughan, M., J. Biol.
Chem. 246, 2195-2202, (1971) .
7. Desai, K.S., Li, K.C., Angel, A.J., J. Lipid Res. 14
647-655, (1973) .
8. Soderling, T.R., Corbin, J.D., Park, C.R., J. Biol.
Chem. 248, 1822-1829, (1973) .
9. Siddle, K., Hales, C.N., Biochem. J. 142, 97-103, (1974).
10. Fain, J.N., Rosenberg, L., Diabetes 21, 414-425, (1972) .
11. Jarrett, L., Steiner, A.L., Smith, R.M., Kipnis, D.M.,
Endocrinology 90, 1277-1284, (1972) .
12. Kissebah, A.H., Tulloch, B.R., Vydellingum, N., Hope-Gill,
H., Clarke, P., Fraser, T.R., Horm. Metab. Res. 6,
357-364, (1974) .

13. Illiano, G., Tell, G.P., Siegel, M.I., Cuatrecasas, P.,
Proc. Natl.Acad. Sci. USA 70, 2443 - 2447, (1973) .
14. Fain, J.N., Butcher, F.R., J. Cyclic Nucleotide Res.2,
71-78, (1976) .
15. Hepp, K.D., Renner, R., FEBS-Lett . 20,2,191 - 194,(1972).
16. Illiano, G., Cuatrecasas,P., Science 175, 906-908, (1972).
17. Loten, E.G., Sneyd. S.G.T.,Biochem.J. 120, 187-193,(1970).
18. Manganiello, V., Vaughan, M., J. Biol. Chem., 249,
7164-7170, (1973) .
19. Zinman, B., Hollenberg, C., J. Biol. Chem., 249,
2182-2187, (1974) .
20. Pawlson, G., Lovell-Smith, C.J., Manganiello, V.C.,
Vaughan, M., Proc. Natl.Acad. Sci. USA 71, 1639 - 1642,
(1974) .
21. Hollenberg, C.H., Hormonal Effects on cyclic Nucleotide
Phosphodiesterase in Adipose Tissue, Vortrag, V. Inter-
national Congress of Endocrinology, Hamburg, 18. -
24. Juli 1976 .
22. Rodbell, M., J.Biol.Chem. 239, 375-380 ,(1964) .
23. Heptner, W., Christ, O., Diabetologia 3, 443 - 448,(1967).
24. Eggstein, M., Kuhlmann, E.,(1970)in Methoden der enzy-
matischen Analyse (Bergmeyer, H.U., Hrsg.), S. 1765-1717,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

25. Schwabe, U., Ebert, R., Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol. 287 -298, (1972) .
26. Brown, B.L., Ekins, R.P., Albano, J.D.M., Adv. Cyclic Nucleotide Res. 2,25 - 40,(1972) .
27. Gilman, A.G., Adv. Cyclic Nucleotide Res. 2, 9 - 15, (1972) .
28. Walton, G.M., Garren, L.D., Biochemistry 9, 4223 - 4229 ,(1970) .
29. Murad, F., Manganiello, V., Vaughan, M., Proc. Natl.Acad. Sci. USA 68, 736-739, (1971) .
30. Murad, F., Gilman, A.G., Biochim. et Biophys. Acta 252, 397-401,(1971) .
31. Rall, T.W., Sutherland, E.W., J. Biol. Chem., 232, 1065-1071, (1958) .
32. Posner, J.B., Hammermeister, R.E., Bratvold, G.E., Krebs, E.G., Biochemistry 3,1040 - 1044 ,(1964) .
33. Butcher, R.W., J. Biol. Chem. 240, 4515 - 4523,(1965).
34. Brooker, G., Biochemistry, 7, 4177 - 4181,(1968) .
35. Breckenridge, P., Proc. Natl.Acad.Sci. USA 52, 1580 - 1586, (1964) .
36. Turtle, J.R., Kipnis, D.M., Biochemistry 6,3970 - 3976, (1967) .
37. Pauk,G.,Reddy,W., Analytical Biochemistry 21, 298 - 307 ,(1967) .

38. Ekins, R.P., Newman, G.B., Riordan, O., 1968 in Radio-isotopes in Medicine, Hrsg. Hayes, R.I., Goswitz, F.A., Murphy, B.E.P.
39. Gliemann, S., Adipose Tissue, Horm. Metab. Res. Suppl. 2, Hrsg. Jeanrenaud, B., Hepp, D., 116-119, (1970).
40. Schwabe, U., Ebert, R., Erbler, H.C., Naunyn - Schmied. Arch. Pharmacol. 276, 133 - 142, (1973) .
41. Wieser, P.B., Fain, J.N., Endocrinology, 96 ,2 , 1221-1225, (1975) .
42. Ho, R.J., Sutherland, E.W., J. Biol. Chem. 246, 6822-6827 (1971) .
43. Ho, R.J., in Adipose Tissue, Horm. Metab. Res. Suppl. 2 , Hrsg. B. Jeanrenaud, D. Hepp , 83 - 87, (1970).
44. Knight, B.L., Iliffe, J., Biochem. J. 132, 77-82 (1973) .
45. Hepp, K.D., Renner, R., Häring, H.U., Mehnert, H., Diabetologia 10, 369 Abs. , (1974).
46. Mahler, R., Stafford, W.S., Tarrant, M.E., Ashmore, J., Diabetes, 13, 297-302, (1964) .
47. Lavis, V.R., Hepp, K.D., Williams, R.H., Diabetes, 19, Suppl. 1, 371 Abs. , (1970) .
48. Weitzel, G., Renner, R., Guglielmi, H., Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 353, 535-539, (1972) .
49. Kono, T., Fed. Proc., 31, 243 Abs. , (1972) .

50. Lavis, V.R., Williams, R.H., Diabetes 22,
629-636, (1973) .
51. Kono, T., Barham, F.W., J. Biol.Chem. 248,
7417-7426, (1973) .
52. Hales, C.N., Chalmers, T.M., Perry, M.C., Wade, D.R.,
Excerpta Med.Int.Congr.Ser. 161, 432-443, (1969) .
53. Vaughan, M., in Insulin Action, Hrsg. Fritz, J.B.,
Academic Press, New York und London, 297-304, (1972) .
54. Weitzel, G., Oertel, W., Rager, K., Kemmler, W., Hoppe-
Seyler's Z. Physiol.Chem.320,57-62, (1969) .
55. Kemmler, W., Rager, K., Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.
349, 515 - 516, (1968).
56. Weitzel, G., Renner, R., Kemmler, W., Rager, K., Hoppe-
Seyler's Z.Physiol. Chem.353, 980 - 986, (1972) .
57. Renner, R., Kemmler, W., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.
Chem. 355, 1555 - 1556,(1974) .
58. Groen, J., Kamminga, C.E., Willebrands, A.F., Blickman,
J.R., J. Clin.Invest. 31, 97 - 106, (1952) .
59. Froesch, E.R, Bürgi, H., Ramseier, E.B., Bally, P.,
Labhart, A., J.Clin.Invest. 42, 1816-1834, (1963).
60. Oelz, O., Froesch, E.R., Bünzli, H.F., Humbel, R.E.,
Ritschard, W.J., In: Handbook of Physiology, Section 7.
Vol. I., (1972), Hrsg.: D.F.Steiner,N.Freinkel (Am.
Physiological Soc., Washington) S.685 .

61. Froesch, E.R., Bürgi, H., Müller, W.A., Humbel, R.E., Jakob, A., Labhart, A., *Rec.Progr.Horm. Res.* 23, 565-616, (1967) .
62. Humbel, R.E., Bünzli, H., Müllly, K., Oelz, O., Froesch, E.R., Ritschard, W.J., *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 231, 306 - 317, (1971) .
63. Megyesi, K., Kahn, C.R., Roth, J., Froesch, E.R., Humbel, R.E., Zapf, J., Neville, D.M., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 57, 307 -315 ,(1974) .
64. Hepp, D. Poffenbarger, P.L., Ensinnck. J.W., Williams, R. H., *Metabolism* 16, 393 - 401, (1967).
65. Hepp, K.D., *Eur. J. Biochem.* 31, 266-276, (1972) .
66. Renner, R., Hepp, K.D., Humbel, R.E., Froesch, E.R., *Horm. Metab. Res.* 5, 56-57, (1973) .
67. Hepp, K.D., Renner, R., Langley, J., Häring, H.U., *Mol.Cell. Endocrinology* 3, 309-321, (1975) .
68. Weitzel, G. Weber, U., Martin, J., Eisele, K., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 352, 1005 - 1013, (1971) .
69. Weitzel, G, Renner, R., Guglielmi, H., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 352, 1617 - 1630, (1971) .
70. Weitzel, G., Renner, R., Guglielmi, H., Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 353, 535 - 539, (1972) .
71. Ebert, R., Schwabe, U., *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.* 278, 247 - 259, (1973) .

72. Davis, J.I., Nature 218, 349 - 352, (1968) .
73. Fain, J.N., Pointer, R.H., Ward, W.F., J.Biol.Chem. 247, 6866 - 6872, (1972) .
74. Mc Kenzie, S.G., Bär, H.P., Can. J. Physiol. Pharmacol. 51, 190 - 196, (1973) .
75. Schwabe, U., Schönhöfer, P.S., Ebert, R., Eur. J. Biochem. 46, 537 - 545, (1974) .
76. Renner, R., Kemmler, W., Hepp, K.D., Eur. J. Biochem. 49, 129 - 141, (1974) .
77. Birnbaumer, L., Biochim. Biophys. Acta 300, 129 - 158, (1973) .
78. Hamprecht, B., Schultz, J., FEBS-Lett. 34, 85 - 89, (1973) .
79. Häring, H.U., Renner, R., Hepp, K.D., Mol. Cell. Endocrinology 5, 295 - 302, (1976) .
80. Hepp, K.D., unveröffentlichte Untersuchungen.
81. Hepp, K.D., Challoner, D.R., Williams, R.H., J. Biol. Chem. 243, 4020 - 4026, (1968) .
82. Angel, A., Desai, K., Halperin, M.L., Metabolism 21, 87 - 99, (1971) .

83. Steinberg,D.,Mayer,E.S.,Khoo,J.C.,Miller,E.A.,
Miller,R.E.,Fredholm,B.,Eichner,E., Adv.Cyclic
Nucleotide Res.5,549 - 568, (1975).
84. Brostrom,C.O.,Corbin,J.D.,King,C.A.,Krebs,E.G.,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 68, 2444 - 2447,(1971) .
85. Corbin,J.D.,Soderling,T.R.,Park,C.R., J.Biol.
Chem.248, 1813 - 1821,(1973) .
86. Zinder,O.,Arad,R.,Shapiro,B., Israel J.Med.Sci.3,6,
787 - 791, (1967) .
87. Goldberg,N.D.,Haddox,M.K.,Nicol,S.E.,Glass,D.B.,
Sanford,C.H.,Kuehl,F.A.,Estensen,R., Adv.Cyclic
Nucleotide Res.5, 307 - 330, (1975) .
88. Bihler,I.,Jeanrenaud,B., Biochim.Biophys.Acta 202,
496 - 506, (1970) .
89. Salans,L.B.,Dougharty,J.W.,J.Clin.Invest.50, 1399 -
1410,(1971) .
90. Harwood,J.P.,Löw,H.,Rodbell,M., J.Biol.Chem.248,
6239 - 6245,(1973) .

Lebenslauf

24. Januar 1951 : geboren in Stuttgart als Sohn des Dr. Hans Häring und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Schöndorf
- 1957 - 1961 : Besuch der Volksschule in Stuttgart
- 1961 - 1969 : Besuch des Eberhard-Ludwigs-Gymnasiums und Reifeprüfung
- 1969 - 1972 : Medizinstudium in Freiburg
- September 1970 : Vorphysikum
- März 1972 : Physikum
- 1972 - 1975 : Medizinstudium in München
- März 1973 : Beginn vorliegender Doktorarbeit unter Anleitung von Priv.Do. Dr. K.D. Hepp im Institut für Diabetesforschung, München (Leitung Prof. H. Mehnert, Prof. O. Wieland)
- Dezember 1975 : Abschluß des medizinischen Staatsexamens

Druck: Behr-Fotodruck
Telefon: (0711) 62 61 18
Reinsburgstraße 84
7000 Stuttgart 1